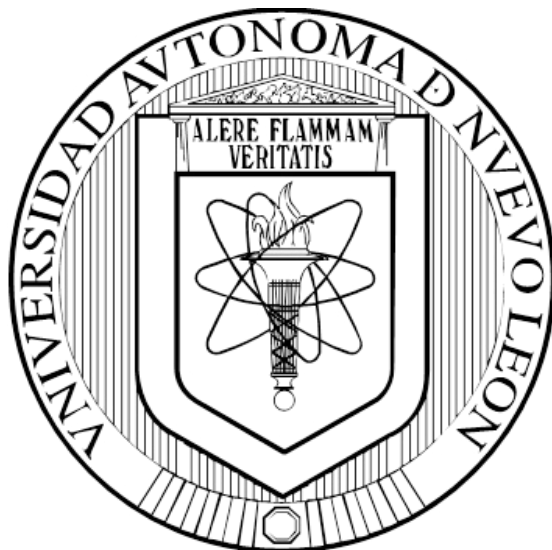


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO Y VARIANTES DEL GEN E6 EN CAVIDAD ORAL DE PACIENTES
ASINTOMÁTICOS DE SILTEPEC, CHIAPAS, MÉXICO.**

POR

L.B.C. CYNTHIA SOFÍA URBINA RÍOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA.**

MARZO, 2018

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO Y VARIANTES DEL GEN E6 EN CAVIDAD ORAL DE
PACIENTES ASINTOMÁTICOS DE SILTEPEC, CHIAPAS, MÉXICO.

Comité de Tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Presidente

Dra. Patricia Tamez Guerra
Secretario

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal

Dr. Moisés Franco Molina
Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavidez
Vocal

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO Y VARIANTES DEL GEN E6 EN CAVIDAD ORAL DE
PACIENTES ASINTOMÁTICOS DE SILTEPEC, CHIAPAS, MÉXICO.

Comité de Tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Director

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas sus bendiciones para mi vida y la de mi familia y por permitirme llegar hasta aquí.

A mis padres, hermanos y esposo. Gracias por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mí y en mis expectativas, por cada consejo y cada palabra de aliento, por apoyarme e impulsarme a ser una mejor persona. Los amo y le doy gracias a Dios por sus vidas.

A Dra. Diana Reséndez Pérez y personal de la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

A mi Director de tesis Dr. Ricardo Gómez Flores, Directora externa Dra. Myriam Angélica De la Garza Ramos y miembros del comité de tesis por su apoyo, paciencia, orientación y disponibilidad que me brindaron para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, CIDICS-UANL por permitir el uso de equipos y materiales.

A CONACYT por el apoyo económico y respaldo durante toda mi estancia en el país.

A todos los Maestros que me transmitieron su conocimiento y su experiencia.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A Dios quién me ha dado la vida y todas las cosas hermosas que me ha concedido llenando mi vida de constante felicidad y gratificación. Gracias también por darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi esposo Víctor Urrutia, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable, enseñándome que siempre hay una luz al final del camino.

A mis padres José Joaquín Urbina Orteiz y Dana Ivonett Ríos Bellorín por no perder la Fe y por dedicarme cada día un pedacito de sus oraciones y sus buenos deseos; por no dejar que me faltara nada y por comprometerme con su admiración expresada desde niño a ser mejor cada día. A ambos, gracias por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles. Esto es un pequeño regalo de todo lo que han hecho por mí, este título es para ustedes, me siento orgullosa de que por fin les entrego este título por el cual luché y me esforcé teniendo como motivación y motor el gran amor que me han inculcado.

A mis hermanos: Dana Ivonne, José Joaquín y Mélida Vanessa Urbina Ríos, por su constante apoyo, por creer en mí y estar siempre presentes ofreciéndome su amor y la calidez de la familia.

Cynthia Sofía Urbina Ríos

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Estructura de la partícula viral y regulación de la expresión génica	5
2.3 Clasificación de VPH	7
2.4 Funciones de las proteínas virales	7
2.5 Propiedades biológicas del VPH	14
2.6 Biología molecular de la infección por VPH	14
2.7 De la infección al cáncer	16
2.8 Lesiones en la cavidad oral	17
2.9 Detección de VPH	18
2.10 Detección de cáncer oral	19
2.11 Distribución de tipos de VPH y variantes del gen E6	20
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVOS	24
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1 Aspectos éticos	25
6.2 Población y tamaño de muestra	25
6.3 Criterios de inclusión	25
6.4 Criterios de exclusión	25
6.5 Toma de la muestra	26
6.6 Tinción con Hematoxilina-Eosina	26
6.7 Estudios citológicos	27
6.8 Extracción de DNA y detección del VPH	27
6.9 Genotipificación en base a la secuencia del gen L1	29
6.10 Identificación de cambios nucleotídicos/aminoacídicos y análisis de variantes en E6 VPH-16	30
6.11 Análisis estadístico	31
VII. RESULTADOS	32
VIII. DISCUSIÓN	42
IX. CONCLUSIONES	46
X. PERSPECTIVAS	47
XI. BIBLIOGRAFÍA	48
XII. ANEXO BIOGRÁFICO	56
XIII. ANEXO 1 (Consentimiento informado)	57

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Proteínas de VPH y sus funciones.....	13
Tabla 2. Distribución de la infección por VPH en la cavidad oral de pacientes asintomáticos por edad, género y hábitos.....	34
Tabla 3. Distribución de la infección por VPH en la cavidad oral de pacientes asintomáticos por conductas sexuales.....	35
Tabla 4. Distribución de la infección oral por VPH en pacientes asintomáticos por antecedente familiar, lesión y estatus gingival	36
Tabla 5. Frecuencias y porcentajes de los genotipos de VPH en los pacientes positivos.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Amplificaciones de PCR convencional para el gen β -actina.	32
Figura 2. Amplificaciones de Nested PCR usando los oligonucleótidos GP5+/GP6+ para región de 150 bp del gen L1 de VPH	33
Figura 3. Prevalencia de VPH en la cavidad oral de pacientes asintomáticos de Siltepec, Chiapas, México.....	33
Figura 4. Amplicones de ~150 bp purificados usando GeneJET NGS Cleanup Kit.....	37
Figura 5. Electroferogramas, alineamientos y análisis de identidad.....	38
Figura 6. Electroferogramas, alineamientos y análisis de identidad.....	39
Figura 7. Variaciones en las secuencias nucleotídica y aminoacídica en E6 de VPH-16.....	40
Figura 8. Variaciones en las secuencias nucleotídica y aminoacídica en E6 de VPH-16	41

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
VPH	Virus del Papiloma Humano
CCE	Carcinoma de células escamosas
COCE	Carcinoma oral de células escamosas
CECC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
CaCu	Cáncer cérvico-uterino
CIN	Lesiones escamosas intraepiteliales
Rb	Retinoblastoma
ORF	Marcos de lectura abierta
HR-HPV	Virus del papiloma humano de alto riesgo
LR-HPV	Virus del papiloma humano de bajo riesgo
E6AP	Proteína asociada a E6
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
URR	Región regulatoria no codificante
LCR	Región larga de control
MEH	Hiperplasia multifocal Epitelial
EA	Variante Europea/Asiática
AA	Variante Asiática/Americana
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
KGFR	Receptor del factor de crecimiento de queratinocitos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
HC2	Sistema de Captura Híbrida 2
H&E	Hematoxilina y Eosina
E	Proteínas tempranas
L	Proteínas tardías
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
HSPGs	Heparán sulfato proteoglicanos
TBE	Tampón Tris-Boro-EDTA

RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de DNA asociado al desarrollo de múltiples enfermedades neoplásicas, entre las que se encuentran el cáncer cérvico-uterino, de pene, anal, vulvar y oral. En los últimos años ha habido un incremento en cáncer oral por VPH lo cual pudiera ser debido a cambios en los hábitos sexuales en la población en general. En México existen pocos reportes sobre esto, por lo que en este estudio se determinó su prevalencia de infección en cavidad oral de pacientes asintomáticos del municipio de Siltepec, Chiapas, México. Se tomaron 198 muestras con citocepillo para la detección del virus mediante Nested PCR utilizando los primers MY09/MY11 y GP5+/GP6+. Los resultados mostraron 12.1% de prevalencia de la infección por VPH. No se observó asociación significativa entre la infección por VPH y el género de los pacientes o el consumo de tabaco o alcohol; sin embargo, esta asociación si fue positiva para variables como el mayor número de parejas sexuales, no utilización de preservativo y prácticas de sexo oral. Posteriormente, se realizaron análisis de secuenciación donde se identificaron los genotipos 13 (21/24), 16 (2/24), 32 (1/24), 81 (1/24) y 83 (1/24), además se obtuvieron dos variantes E6 del VPH-16, una pertenece al linaje Europeo/Asiático y la otra al Asiático/Americano. Estos resultados nos muestran una importante prevalencia de la infección por VPH en cavidad oral donde los genotipos predominantes están asociados con patologías benignas y que las variantes de los genotipos de alto riesgo provienen de diferentes linajes.

ABSTRACT

The human papilloma virus (HPV) is a DNA virus associated with the development of multiple neoplastic diseases, among which are cervical cancer, penile cancer, anal cancer, vulvar cancer and oral cancer. In recent years there has been an increase in oral cancer due to HPV which could be due to changes in sexual habits in the general population. In México there are few reports on this, therefore, in this study the prevalence of infection by this virus in oral cavity of asymptomatic patients from the municipality of Siltepec, Chiapas, Mexico was determined. 198 samples were taken with cytobrush for virus detection by Nested PCR using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+. The results showed a 12.1% prevalence of HPV infection. No significant association was observed between HPV infection and the gender of the patients or the consumption of tobacco or alcohol; however, this association was positive for variables such as the number of sexual partners, not utilization of condoms and oral sex practices. Furthermore, sequencing analyzes were performed where genotypes 13 (21/24), 16 (2/24), 32 (1/24), 81 (1/24) and 83 (1/24) were identified; in addition, two E6 variants of HPV-16, one belonging to the European/Asian lineage and the other to the Asian/American one were obtained. These results evidenced an important prevalence of HPV infection in the oral cavity where the predominant genotypes were associated with benign pathologies and that the variants of the high risk genotypes derived from different lineages.

I. INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de DNA que infecta las superficies de la mucosa y actualmente se reconoce como un factor etiológico en un subconjunto creciente de cánceres como el cáncer de cérvix, pene, vulvar, vaginal, anal y orofaríngeo, por lo que su detección es de suma importancia en la toma de decisiones terapéuticas (Groves y Coleman 2015).

Harold Zur Hausen fue el pionero en la investigación de los VPH relacionados con cáncer, por lo que fue merecedor del premio Nobel en la década de 1970; logró aislar el genoma de VPH en verrugas genitales, posteriormente mediante técnicas de hibridación y restricción, Zur Hausen y su equipo descubrieron que no todos los virus aislados eran idénticos, por lo que procedió a clasificarlos por tipos, según se iban descubriendo.

Estudios recientes han reportado un incremento en el número de casos de cáncer de la cavidad oral, constituyendo un serio problema alrededor del mundo. El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tumor maligno más frecuente que nos podemos encontrar en la cavidad oral, con una frecuencia del 90% (Sidrón *et al.* 2015). En el 2012, estudios estimaron 300,400 nuevos casos y 145,400 muertes por éste tipo de cáncer, incluyendo cáncer de labios (Torre *et al.* 2012). Según la OMS, el cáncer de cavidad oral y orofaringe representó en 2010 la séptima causa de cáncer en el mundo. En México se reportan 4,000 nuevos casos de cáncer/año (OMS 2010).

El VPH tiene la particularidad de requerir una microabrasión o un área de transición de epitelios, como la que existe en el cuello uterino, ano o amígdalas, para poder infectar las células. La infección se presenta en los queratinocitos basales del epitelio escamoso estratificado y el virus se replica en el núcleo de las células infectadas, además de interferir en la diferenciación de estas mismas células.

El VPH tiene la capacidad de estimular de forma continua el crecimiento tumoral, lo que favorece que en un periodo habitualmente largo se generen mutaciones al azar en el

genoma celular, con la esperable consecuencia de que algunas de ellas le confieran mayor capacidad oncógena a la célula neoplásica (Benuto y Berumen 2009).

La infección por VPH se encuentra de manera más frecuente en jóvenes mayores de 15 años, disminuyendo al llegar a los 50 años. Se estima que el 80% de la población mundial está o estará infectada por VPH en algún momento de sus vidas, pero sólo un 5-10% desarrollará cáncer, por lo que se requiere la presencia de otros factores tales como iniciación de la actividad sexual de manera temprana, múltiples parejas sexuales, múltiples partos, tabaquismo, alcoholismo e inmunodeficiencias. Además, la co-infección con otros virus puede potenciar la tumorigénesis (Ghittoni *et al.* 2015).

Los virus del Papiloma Humano son miembros de la familia *Papillomaviridae* y constan de un genoma circular de DNA de doble cadena de 8kb aproximadamente, el cual contiene 6 genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y 2 tardíos (L1 y L2). El gen L1 es el principal implicado en la codificación de las proteínas de la cápside viral y por tanto, es usado para la clasificación y construcción de árboles filogenéticos ya que se encuentra bien conservado entre los distintos genotipos de VPH.

La historia natural de la infección por VPH en la cavidad oral y la orofaringe no está del todo clara, aunque hay algunas características similares a las descritas para el cuello uterino. Las similitudes histológicas entre las áreas cérvico-vaginal y orofaríngea, ambas recubiertas con epitelio escamoso o ligeramente queratinizado, y la capacidad del virus para immortalizar los queratinocitos orales humanos *in vitro*, han permitido transferir el concepto de oncogenicidad inducida por el VPH del área ginecológica a la cavidad oral (Sanders *et al.* 2013).

En la actualidad se han desarrollado tres vacunas anti-VPH que se encuentran en el mercado. Su efectividad está comprobada en la prevención de malignidades de cérvix en mujeres no infectadas, pero aún no se ha podido determinar su eficacia ante infecciones por VPH en otras áreas del cuerpo. Esta investigación sobre los genotipos presentes en cavidad oral de pacientes asintomáticos puede aumentar los conocimientos sobre la prevalencia y variantes de VPH presentes en esta ciudad, ya que no hay estudios realizados en dicha población.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

La infección por el virus del papiloma humano es considerada la infección más común transmitida sexualmente. Se estima que 6 millones de personas son diagnosticadas cada año y aproximadamente 9-13% de la población mundial (630 millones de personas) se encuentran ya infectados con este virus (Pagliusi 2013).

El rol etiológico de la infección por VPH en el desarrollo de Carcinoma de Células Escamosas (CCE) de la cavidad cérvico-uterina está ampliamente demostrada, causando tumor en la mayoría de los casos debido a la persistencia de la infección por genotipos atípicos de alto riesgo. También hay suficiente evidencia que soporta el rol causal de estos virus en la patogénesis del Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello (CECC) (Gillison *et al.* 2000).

Diversos estudios han reportado un incremento en la infección del VPH en cavidad oral, lo cual pudiera ser debido a cambios en los hábitos sexuales en la población en general. Las características epidemiológicas de la infección por VPH en ambas áreas genital y orofaríngea, con una amplia exposición a la infección en pacientes a edades tempranas, haciendo al VPH una infección endémica (Candotto *et al.* 2017).

Los factores de riesgo generalmente aceptados para los cánceres de la cavidad oral (incluyendo tumores de la lengua, el suelo de la boca, las encías, paladar, mucosa labial y otros sitios de la boca) son el consumo de tabaco y el consumo de bebidas alcohólicas (Sierra *et al.* 2008).

La población adulta sana muestra una prevalencia para cualquier tipo de VPH de 2-8% en la cavidad oral, siendo el tipo VPH-16 identificado con mayor frecuencia. Cabe destacar que la prevalencia de VPH parece ser significativamente mayor en los hombres que en las mujeres (Bui *et al.* 2013; Kero *et al.* 2012). Por otra parte, el comportamiento sexual de alto riesgo, incluyendo el sexo oral-genital se ha encontrado asociado con la transmisión de las infecciones por VPH en sitios genitales y orales (D'Souza *et al.* 2009). Cabe resaltar que en pacientes inmunocompetentes, la mayoría de las infecciones por VPH son eliminadas de forma natural en el transcurso de un año

después de su adquisición, sin embargo, cuando existe una deficiencia en la respuesta inmune aumenta la probabilidad de que haya una progresión a cáncer.

El proceso de carcinogénesis cervical supone la implicación de una serie de eventos, de los cuales la actividad sexual ocupa el primero, puesto que permite la entrada del virus en las células basales del epitelio cervical. Si la infección inicial no se resuelve y se hace persistente puede iniciarse un proceso de oncogénesis que puede inducir la aparición de lesiones escamosas intraepiteliales (CIN) (Muñoz *et al.* 2006).

Aunque la infección por VPH es muy frecuente en la población, la mayoría de las mujeres la eliminan y no progresa. Por tanto es necesaria la existencia de otros factores y cofactores que influyen en el proceso de carcinogénesis, algunos favorecen la regresión de la enfermedad mientras que otros modulan la progresión de la misma (Muñoz *et al.* 2006).

Factores potenciales para el desarrollo de cáncer:

-Cofactores medioambientales o exógenos: uso prolongado de anticonceptivos hormonales, hábito tabáquico, alta paridad, co-infección con otras enfermedades de transmisión sexual como el VIH, *Chlamydia trachomatis* o el Herpes Virus.

-Cofactores virales: infección por tipos de alto riesgo, co-infección con otros tipos de VPH, variantes de VPH, carga viral e integración viral.

-Cofactores del huésped: hormonas endógenas, factores genéticos, factores relacionados con la respuesta inmunitaria (Ghittoni *et al.* 2015; Muñoz *et al.* 2006).

El CECC es un grupo heterogéneo de neoplasias anatómicas que surgen de la superficie de la mucosa de la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe, laringe y la nasofaringe. Cada año, aproximadamente 263,000 casos de cáncer de cavidad oral y 135,000 casos de faringe son diagnosticados en todo el mundo (Sidrón y Somacarrera 2015).

El cáncer oral es un serio problema que está aumentando en prácticamente todo el mundo. Es más común en pacientes de 50 años en adelante y en muchos países es más

común en hombres que en mujeres, esto suele deberse a hábitos de riesgo o exposición al sol como parte algunas profesiones (Sidrón y Somacarrera 2015; Lingen *et al.* 2008). Es una enfermedad multifactorial, en la que el tabaco y el alcohol juegan un papel muy importante, pero se puede prevenir evitando los factores de riesgo pertinentes, así como acudir a revisiones anuales al dentista. El 90% de los tumores malignos primarios son carcinomas orales de células escamosas (COCE), siendo más frecuente en borde lateral de la lengua (Ghittoni *et al.* 2015) y su tratamiento dependerá del estadio en el que se encuentre la lesión (Neville y Day 2002). El cese de hábitos como el tabaco y el alcohol, o cualquier factor de riesgo que pueda aumentar el riesgo de padecer cáncer oral, así como el diagnóstico temprano de las lesiones orales precancerosas y de cáncer de células escamosas en estadios iniciales pueden facilitar el tratamiento y ayudar a mejorar el pronóstico, reduciendo la mortalidad (Sidrón y Somacarrera 2015; Neville y Day 2002).

2.2 Estructura de la partícula viral y regulación de la expresión génica

VPH es un virus relativamente pequeño sin envoltura que contiene un genoma de DNA circular cerrado de doble cadena, asociado con proteínas histonas y protegido por una cápside formada por dos proteínas tardías, L1 y L2. Cada cápside está compuesta de 72 capsómeros, cada uno de los cuales se compone de cinco unidades monoméricas de 55 kDa que se unen para formar un pentámero que corresponde a la proteína de cápside principal, L1. Además de L1, proteínas de la cápside menores con aproximadamente 75 kDa existen dentro del virión, llamadas proteínas L2 (Zur Hausen 2009).

El genoma viral de VPH contiene aproximadamente 8000 pares de bases y alberga un promedio de 8 marcos de lectura abierta (ORFs). En un funcional punto de vista, el genoma de VPH está dividido en tres regiones. La primera es una región regulatoria no codificante localizada río arriba (URR) o región larga de control (LCR) que tiene la función de regulación de la transcripción de los genes virales E6 y E7; La segunda es una región temprana (E), que consta de seis ORFs: E1, E2, E4, E5, E6, y E7, que codifica proteínas estructurales no implicadas en la replicación viral y la oncogénesis. El tercero es una región tardía (L) que codifica las proteínas estructurales L1 y L2 (Jo y Kin 2005).

Sólo una cadena del DNA de doble hebra sirve como plantilla para la expresión de genes virales, que codifica para un número de transcripciones de mRNA policistrónico (Stanley *et al.* 2007). La regulación de la expresión génica viral es compleja y está controlada por factores de transcripción celular y viral. La mayoría de estas regulaciones tienen lugar dentro de la región LCR, que contiene elementos reguladores de transcripción activos. Estas secuencias están vinculadas por un número de factores celulares, así como el producto E2 viral (Zur Hausen 2009).

Los sitios de inicio de la transcripción de los promotores virales varían en función del tipo de virus, pero, de todos los tipos, el uso de queratinocitos promotor es dependiente de la diferenciación. El origen de replicación y muchos elementos reguladores de la transcripción se encuentran en la región río arriba del LCR. E1 E2, E4, E5 y E8 están implicados en la replicación del DNA del virus, el control de la transcripción, más allá de otras funciones y fines de L1 y L2, responsables del ensamblaje de las partículas virales (Hamid *et al.* 2009; Bodily y Laimins 2011).

La regulación de la expresión de los genes tardíos en los VPH genitales no se entiende bien. Sin embargo, se ha demostrado que la segunda, o más tarde, el promotor se inicia de una manera dependiente de la diferenciación, y por lo tanto se activa sólo cuando las células se cultivan en estratificación del huésped/diferenciación de tejido. Una vez activado, el promotor más tarde dirige la transcripción de un conjunto heterogéneo de los sitios de inicio y servirá para producir una serie de transcripciones que facilitan la traducción de proteínas L1 y L2 (Conway *et al.* 2009; Stanley *et al.* 2007). La activación del promotor más tarde se acompaña de aceleración de la replicación del DNA viral y por altos niveles de expresión de la proteína viral. Como resultado, el número de copias virales se amplifica a partir de 50 copias a varios miles de copias por célula. Así que cuando se activa un promotor tardío, se producirá la expresión de genes, que codifican las proteínas estructurales L1 y L2, que se unen para montar las cápsides y para formar viriones (Stanley *et al.* 2007; Bodily y Laimins 2011).

2.3 Clasificación de VPH

Virus de bajo riesgo

Virus de papiloma humano de bajo riesgo (*LR-HPV*) se les llama a aquellos cuyo riesgo de provocar cáncer es bajo y son el VPH 6, 11, 40, 42, 53, 54 y 57. Los VPH que provocan verrugas genitales, también llamado condiloma acuminado y cresta de gallo, están en este grupo. *LR-HPV* pueden causar cambios leves en los pacientes, los cuales por lo general desaparecen espontáneamente. Estos cambios no conducen al cáncer, no son perjudiciales y desaparecen con el tiempo (Veríssimo y Medeiros 2012).

Virus de alto riesgo

Los virus de papiloma humano de alto riesgo (*HR-HPV*) son los que se encuentran con mayor frecuencia asociados en los casos de cáncer de cuello uterino e incluyen el VPH 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58. De estos, el VPH 16 y el 18 son, sin duda, los más importantes dado que se encuentran con más frecuencia vinculados al cáncer cérvicouterino y cáncer oral (Veríssimo y Medeiros 2012).

2.4 Funciones de las proteínas virales (Tabla 1)

Proteína E1

La proteína E1 representa una de las proteínas más conservadas entre los diferentes tipos de VPH. Tiene funciones de unión al DNA y un sitio de unión en el origen de replicación localizada en la región de LCR. Se ensambla en un complejo hexamérico, con el apoyo de la proteína E2, y el complejo resultante tiene una actividad helicasa e inicia la desnaturalización bidireccional del DNA, lo que constituye un requisito previo para la replicación del DNA viral (Wilson *et al.* 2005).

Proteína E2

El marco de lectura abierto de E2 de VPH da lugar a múltiples productos de genes mediante splicing alternativo de RNA. Las proteínas derivadas del gen E2 están implicadas en el control de la transcripción viral, la replicación del DNA, y la segregación de los genomas virales. Estos diferentes tipos de E2 representan los principales reguladores intragenómicos (McPhillips *et al.* 2006).

La proteína E2 puede unirse a factores de la cromatina mitótica y unir el genoma viral a los cromosomas de las células huésped durante la mitosis; lo que contribuye a la coordinación de la replicación del DNA del VPH con la duplicación del cromosoma de la célula huésped, permitiendo que los genomas virales sean distribuidos a la célula hija. Esto constituye un requisito importante para la persistencia del DNA del virus en las células basales no diferenciadas. Además, la proteína E2 es capaz de interactuar con L1, así como con E1, actuando como un complejo de reconocimiento del origen que carga adecuadamente la helicasa para el inicio de la replicación viral (McPhillips *et al.* 2006). En las lesiones que contienen episomas de VPH, la proteína E2 directamente reprime la expresión de genes tempranos como un mecanismo para regular el número de copias. Además, se ha informado de que las proteínas E2 del VPH son capaces de reprimir la actividad del promotor de la telomerasa mediada por la proteína E6 de VPH. La integración del genoma VPH en el cromosoma de la célula huésped generalmente altera la expresión de E2, causando una expresión desregulada de los genes virales tempranos, incluyendo E6 y E7, y este evento puede favorecer la transformación de células humanas y de la transición a un estado maligno (Romanczuk y Howley 1992).

Proteína E4

El gen E4 está localizado en la región E y se traslapa con E2 pero es transcrito en un marco de lectura diferente. A pesar de ser considerada una proteína temprana, la proteína E4 es expresada primariamente en etapas tardías y es la proteína viral más abundante expresada durante el ciclo de vida del virus (Zur Hausen 2009).

Aunque su expresión se produce en las células altamente diferenciadas que expresan los genes de la cápside y sintetizan nueva progenie de viriones, y coincide con el inicio de la replicación del DNA viral vegetativo, E4 no se encuentra en las partículas de virión. El papel de esta proteína en el ciclo de vida del virus todavía no se ha determinado, pero E4 no se requiere para la transformación o la persistencia episomal del DNA viral, sino que interactúa con las redes de queratina y provoca su colapso (Doorbar *et al.* 1991).

Se ha sugerido que E4 puede tener un papel importante en favorecer y apoyar a la amplificación del genoma de VPH, además de regular la expresión de los genes tardíos,

controlando la maduración del virus y facilitando la liberación de los viriones. (Longworth y Laimins 2004).

Proteína E5

La proteína E5 es un pequeño péptido hidrófobo, aproximadamente 83 aminoácidos de tamaño que se localiza principalmente en el retículo endoplásmico. Cuando se expresa solo, VPH E5 tiene propiedades oncogénicas débiles, pero en los ensayos de cultivo de tejidos, VPH E5 puede aumentar la actividad transformadora de E6 y E7, lo que sugiere que puede tener un papel de apoyo en la progresión tumoral. La localización de E5 al retículo endoplásmico sugiere que su actividad puede estar relacionada con el tráfico de proteínas de la membrana citoplásmica a través de este compartimiento celular. También se ha informado que E5 altera la actividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), además de reducir los niveles de la superficie de complejo principal de histocompatibilidad (*MHC*) de proteínas clase I y la modulación de la vía MAPK (Moody y Laimins 2010).

La actividad de la proteína fusogénica *HR-HPV* E5 contribuye a la fusión entre las células generando aneuploidía con células tetraploides y la inestabilidad cromosómica. Estos acontecimientos parecen preceder y favorecer la integración de los genomas de VPH, que a su vez, conduce a la expresión de transcritos de fusión celular-viral y mejora aún más la expresión de los genes E6-E7, lo que les brinda a las células transformadas fuertes ventajas de crecimiento. De este modo, la desregulación del ciclo celular inducida por la fusión de células E5 *HR-HPV* y parece tener un papel importante en las primeras etapas del proceso de transformación. Esto sugiere que la fusión celular inducida por E5 *HR-HPV* puede ser un evento crítico en la etapa temprana del desarrollo de cáncer de cuello uterino asociado al VPH (Gao y Zheng 2010; Zur Hausen 2009).

Proteína E6

Está formada por aproximadamente 150 aminoácidos. La propiedad más conocida de las proteínas E6 de *HR-HPV* es la capacidad de unirse y degradar la proteína supresora de tumor p53, a través del reclutamiento de la proteína asociada a E6 (E6-AP), una ligasa celular E3 que no se une a p53 en la ausencia de E6. Ambas proteínas E6 de *HR-HPV* y

LR-HPV se unen a p53, pero la interacción es más fuerte en *HR-HPV* (Lechner y Lainins 1994).

La proteína E6 puede superar el arresto celular y las actividades pro-apoptóticas de p53 por la orientación de la degradación de p53, la inactivación de la vía Mdm2. E6 también puede inhibir la actividad transcripcional de p53 independientemente de E6-AP. Se han propuesto tres mecanismos diferentes para explicar esta inactivación de p53: La primera es la inhibición de la unión de p53 con su secuencia diana en el genoma; segundo, E6 puede ser capaz de inhibir la señalización de p53 por su mantenimiento en el citoplasma; y en tercer lugar, el mecanismo empleado por E6 para inhibir la actividad de p53 es la abrogación de la transactivación de genes p53 de respuesta a través de la interacción, ya sea con la CBP / p300 o histona acetiltransferasas hADA3 (Thomas y Chiang 2005).

La degradación o el bloqueo de la función de p53 inhibe la señalización de apoptosis que podría eliminar la infección por VPH de la célula. Hay dos grandes vías de apoptosis que pueden ser provocada por diferentes tensiones: las vías extrínseca e intrínseca. La proteína E6 es capaz de interrumpir ambas vías para facilitar un entorno citoprotector y prevenir la muerte celular (Howie *et al.* 2009).

En adición, E6 se une a otras numerosas proteínas, incluyendo co-activadoras de la transcripción (p300, interferón regulatorio factor 3, myc), proteínas involucradas en la polaridad y motilidad celular, supresoras de tumores e inhibidoras de apoptosis (p53) y proteínas de replicación y factores de reparación del DNA (mcm7). E6 induce la expresión y actividad de la telomerasa: la cual es responsable de la immortalización de la célula por E6, sin embargo, el mecanismo preciso por el cual E6 realiza este efecto es aún desconocido (Hamid *et al.* 2009).

Proteína E7

La proteína E7 consta de alrededor de 100 aminoácidos de longitud y contiene tres regiones conservadas: CR1, CR2 y CR3. E7 induce la proliferación celular por unión a múltiples factores. La interacción mejor caracterizada es con la proteína supresora de tumores RB y los miembros relacionados a la familia p107 y p130. La unión de *HR-HPV* a pRB rompe la interacción entre pRB y E2F, una familia de factores de transcripción, resultando en la expresión constitutiva de genes responsivos de E2F, tales como ciclina A y ciclina E, y promueve la entrada prematura a la fase S, síntesis del

DNA y la progresión del ciclo celular. Sin embargo, en células sobreexpresando la proteína E7 de VPH, este punto de control de transición de la fase G1 a la fase S se pierde y las células continúan su ciclo celular, causando una proliferación celular descontrolada (Jo y Kim 2005; Huh *et al.* 2007).

Otra acción de E7 que contribuye a la immortalización celular es su interacción con inhibidores de CDK (p21 y p27), neutralizando eficientemente sus efectos inhibitorios en la actividad de CDK, un importante factor para la entrada a la fase S y progresión (Moody y Laimins 2010).

E6 y E7 interfieren con los efectos de varias citoquinas inhibitorias del crecimiento que son inducidas después de la infección. Proteínas de *HR-HPV* reprimen la transcripción de múltiples factores de genes inducibles de interferón (IFN) y bloquean la apoptosis uniéndose a receptor 1 de TNF, inhibiendo la formación del complejo de señalización que induce la muerte y consecuente transducción de señales apoptóticas. La exposición a E7 en un ambiente epitelial no inflamatorio puede ser suficiente para inducir una tolerancia periférica a E7 en la población de linfocitos T citotóxicos (Tindle 2002).

Proteína L1

El gen L1 corresponde a una secuencia de acerca de 1200 pares de bases, las cuales codifican una proteína estructural altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH. La proteína L1 está formada por cinco unidades monoméricas de 55kDa que se unen para formar una estructura pentamérica, en total son 72 por cada cápside. Esta proteína es altamente inmunogénica y tiene epítopes conformacionales que inducen la producción de anticuerpos específicos neutralizantes contra el virus, los cuales previenen la infección (Buck *et al.* 2008; D'Andrilli 2010).

Comparación entre secuencias L1 de distintos papilomavirus sugieren un dominio conservado de unión a heparina en el extremo C-terminal, y el anclaje de este dominio de L1 previene la unión de ambas heparinas y queratinocitos humanos- sin embargo, se cree que la proteína mayor de la cápside L1 contiene el principal determinante requerido para la unión inicial de la partícula viral a receptores de la superficie celular, *HSPGs*, y por tanto tiene un importante rol en la infección (Schiller *et al.* 2010).

Proteína L2

Es un componente secundario de la cápside viral y se presenta en un número variable de copias por cada cápside, siendo localizado en la superficie interna de la cavidad central debajo de los pentámeros de L1, donde son organizados para formar la cápside. A pesar de la escasez de L2 en el virión, ésta proteína recientemente ha mostrado tener muchas más funciones que un rol simplemente estructural. L2 contribuye a la unión del virión en el receptor celular, favoreciendo su captación, transporte al núcleo, y liberación del DNA viral en los centros de replicación. Además, L2 también ayuda al empaquetamiento del DNA viral dentro de cápsides y, debido a la presencia de usuales epítopes neutralizantes en la proteína L2 de muchos papilomavirus, ésta puede ser instrumental confiriendo inmunidad a través de diferentes tipos de VPH. L2 también contribuye a la interacción del virión en la superficie celular. El anclaje del N-terminal de L2 es necesario para la unión de L1 al receptor secundario, indicando que L2 tiene un rol importante en la infección por VPH (Schiller *et al.* 2010).

Tabla 1. Proteínas de VPH y sus funciones

Proteína	Función
E1	ATPasa y DNA helicasa; reconocer y unirse al origen viral de replicación del DNA como un complejo hexamérico, necesario para la replicación del DNA viral.
E2	Controlar la replicación, transcripción y segregación del genoma viral. Recluta a E1 en el origen.
E4	Favorecer y apoyar la amplificación del genoma del VPH, además de regular la expresión de los genes tardíos, el control de la maduración del virus, y facilitar la liberación de los viriones.
E5	Potenciar la actividad transformadora de E6 y E7; promover la fusión entre las células, la generación de aneuploidía y la inestabilidad cromosómica; contribuir a la evasión de la respuesta inmune.
E6	Unirse y degradar la proteína p53 supresora de tumores, inhibir la apoptosis; interactuar con las proteínas de la respuesta inmune innata, contribuyendo a la evasión y persistencia del virus; activar la expresión de la telomerasa.
E7	Unirse y degradar la proteína supresora de tumores pRB; aumentar la actividad CDK; afectar a la expresión de los genes de fase S mediante la interacción directa con los factores E2F y con las histonas desacetilasas; Inducir una tolerancia periférica en los linfocitos T citotóxicos (CTL) y regular por disminución la expresión de TLR9, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune.
L1	Proteína mayor de la cápside; contiene el determinante principal requerida para la unión a receptores de superficie celular. Es altamente inmunogénica y tiene epítomos conformacionales que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus.
L2	Proteína menor de la cápside; su función es contribuir a la unión del virión en el receptor de la célula, lo que favorece su captación, el transporte al núcleo, y la entrega de DNA viral a los centros de replicación. Además, E2 ayuda al empaquetamiento del DNA viral en cápsides.

2.5 Propiedades biológicas del VPH

Ciclo viral

La mayoría de los virus infectan y se replican dentro de una célula diana. En las infecciones por VPH, sin embargo, la síntesis de los nuevos viriones ocurre solo después de que la célula infectada ha sufrido mitosis y una de las células hijas infectadas se ha diferenciado. VPH infecta células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado que queda expuesto como resultado del microtrauma. Éstas son las únicas células proliferando en el epitelio normal. Luego de la infección, los genomas de VPH son establecidos como elementos extracromosómicos o episomas. Estos genomas no codifican enzimas necesarias para la replicación viral, y utilizan las proteínas de replicación de las células hospederas para mediar la síntesis de su DNA. Las células suprabasales permanecen activas en el ciclo celular hasta que experimentan diferenciación, y un subconjunto de células vuelven a entrar a la fase S en la capa epitelial superior para replicar sus genomas en un proceso llamado amplificación. Esto es seguido de síntesis de proteínas de la cápside, ensamblaje y liberación (Schiller *et al.* 2010).

2.6 Biología molecular de la infección por VPH

El epitelio está compuesto por una amplia proliferación celular y diferenciación de queratinocitos, que son los elementos celulares anfitriones para la infección por VPH y su replicación (Hernán *et al.* 2013; Cruz y Meyers; 2013). Los queratinocitos son encargados de la transición de células malignas a través de la inmortalización y transformación, iniciada por la presencia de HR-HPV que con frecuencia resultará en CCE (Schiller *et al.* 2010). La transmisión del VPH penetra las microheridas o abrasiones en la epidermis para acceder y/o detener la proliferación de células en el epitelio basal. Una vez ahí, utilizará el anfitrión como maquinaria de replicación celular para iniciar la replicación del DNA viral, así mismo, conduce a la expresión de las seis proteínas virales no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7). Las proteínas E5, E6 y E7 corresponden a los oncogenes virales y su expresión induce a la mencionada inmortalización y transformación. E6 y E7 inactivan p53 y Rb, respectivamente, mientras que E5 contribuye a la progresión del tumor y si se expresa por sí sola, E5

también aporta con los mecanismos de inmunoescape y en la vía de receptores para los factores de crecimiento *EGFR* y *KGFR* (Lima *et al.* 2014). Una lesión persiste si se logra vincular el DNA del VPH en el genoma del huésped, seguido de una interrupción del gen E2, la pérdida del gen E5 y aumento de las proteínas E6 y E7 (Liu *et al.* 2015).

El VPH penetra la membrana basal del epitelio escamoso estratificado que poseen todas las mucosas; esta lámina se compone de estas células en constante actividad mitótica, el ciclo de vida del VPH y su expresión proteica se relaciona directamente con la diferenciación de la célula infectada. Esto ocurre mediante la unión entre receptores celulares y el virus, principalmente heparán sulfato para VPH-16 y $\alpha 6$ -integrina para VPH-6. El heparán sulfato actúa como mediador inicial del virus en la célula, permitiendo a las partículas virales entrar a través de endocitosis, una vez dentro de la célula hospedera, el DNA viral se replica a medida que la capa basal se diferencia y migra a la superficie del epitelio. Mientras el virus se encuentra en la capa basal se mantiene en estado episomal con pocas copias de DNA utilizando la maquinaria celular para la replicación de su genoma. Cuando la célula se va diferenciando y el virus aumenta su tasa de replicación (Schiller *et al.* 2010).

La replicación del DNA viral comienza con la interacción de los factores de transcripción de la célula con la región LCR del virus y los genes virales E6 y E7 son los primeros en ser transcritos. La proteína E6 se une con una proteína celular denominada proteína asociada a E6 (E6AP) que cumple una función de ubiquitina ligasa, E6 aumenta la afinidad de E6AP por p53 promoviendo la rápida degradación de p53 (Leemans *et al.* 2011).

Por otra parte, la proteína E7 viral se puede unir a la forma hipofosforilada de la proteína retinoblastoma (RB). Esta unión rompe el complejo entre RB y el factor de transcripción E2F-1, por lo que E2F-1 queda libre y se une a promotores de genes necesarios para que la célula entre en fase S del ciclo celular y así comenzar su transcripción. Sin duda, el principal factor para el desarrollo de las lesiones cancerosas es la sobreexpresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 las cuales dan como resultado final la sobreexpresión del gen supresor de tumor P16 (Cortés *et al.* 2013).

2.7 De la infección al cáncer

Los virus infectan los queratinocitos basales primitivos, pero los niveles de expresión elevada de proteínas virales y el ensamblaje viral, ocurren exclusivamente en las capas del estrato espinoso y granuloso del epitelio escamoso. La expresión de genes virales está confinada al queratinocito. Poco después de la infección, la replicación de los episomas virales parece ser independiente del ciclo celular y se producen aproximadamente de 50 a 100 copias por célula (Zaldívar *et al.* 2012). Se cree que la célula deja este estado primitivo para transformarse en una célula proliferativa del epitelio. En esta etapa la expresión viral es mínima, la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 están bajo un control muy estricto, por lo que sus transcritos son escasamente detectables. Cuando el queratinocito entra al estatus de diferenciación, sale del ciclo celular e inicia un aumento masivo en la expresión de los genes virales, formándose al menos 1000 copias de virus por célula, con abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 y la expresión de genes tardíos (Longworth y Laimins 2004). El VPH codifica sólo una proteína para la replicación del DNA, la enzima E1 y además de esta la proteína viral E2, fuera de ello, la replicación viral es totalmente dependiente de la maquinaria de síntesis del DNA celular. El problema para los virus es que las DNA polimerasas celulares y los factores de replicación sólo se producen en células con mitosis activa. Para resolver este problema, los virus codifican proteínas del ciclo de vida viral, que reactivan la síntesis de DNA celular en células sin ciclo celular, inhibe la apoptosis y retarda el programa de diferenciación del queratinocito infectado, creando un ambiente que es permisivo para la replicación del DNA viral. Los detalles a fondo no son bien conocidos, pero los genes virales centrales para estas funciones son el E6 y el E7 (Wentzenzen *et al.* 2004).

En esta estrategia de replicación el DNA viral se replica y el virus se ensambla en una célula que estaba destinada a morir por causas naturales; no hay citólisis inducida por el virus, no hay necrosis y de ahí que no induzca inflamación, lo cual dificulta la activación de las células dendríticas y del inicio de una respuesta inmune efectiva. Este virus no produce viremia, por lo que pasa desapercibido por el sistema inmune. Además, al igual que todos los DNA virus, tiene mecanismos para inhibir la síntesis de interferón por la

célula huésped. Estas estrategias virales generan infecciones crónicas por largos periodos de tiempo sin que el huésped se entere (Zaldívar *et al.* 2012).

Durante la fase inicial de infección, el VPH existe como un episoma nuclear, pero la integración del *HR-HPV* al DNA del genoma huésped es un paso importante en la progresión neoplásica del cérvix. La integración causa delección o alteración del gen regulador viral E2, en tanto retiene un segmento variable que incluye a los genes E6 y E7, lo cual origina el incremento de la expresión de los oncogenes virales. Las células que contienen al virus integrado, adquieren ventajas de crecimiento sobre las que contienen episomas virales, lo cual provoca la expansión clonal de estas células. Estas células tienen inestabilidad genómica lo que conduce a la progresión de la malignización (Zaldívar *et al.* 2012).

2.8 Lesiones en la cavidad oral

Las lesiones producidas por estos virus se pueden clasificar en dos grupos: lesiones benignas y lesiones potencialmente cancerígenas o malignas (Luciano y Oviedo 2013). Las cuales se describen a continuación:

Papiloma oral. Lesión benigna que afecta a niños y adultos, pero tiene cierta predilección por personas de 30 a 50 años, los sitios de localización son: lengua, paladar blando, vulva, frenillo y bermellón. Su coloración depende del grado de queratinización y puede ir del blanco al rosado. Por lo general son lesiones solitarias, indoloras, de un tamaño aproximado de 1 cm de diámetro y de crecimiento rápido, una forma de contagio del VPH es por contacto directo, estas lesiones son ocasionadas principalmente por los subtipos de VPH 6 y 11 (Luciano y Oviedo 2013).

Verruga vulgar. Es una lesión benigna, papilomatosa escamosa, localizada frecuentemente en lengua, paladar blando, labio y bermellón, común en niños y adolescentes; su prevalencia es igual en ambos géneros. Se contagian por contacto directo entre las personas o por auto-inoculación. La verruga vulvar se encuentra asociada con mayor frecuencia a VPH-2, -57, -4, -6 y -40 (Luciano y Oviedo 2013).

Condiloma acuminado. Pueden presentarse en la mucosa oral, tienen apariencia nodular, blanda y sésil, de tamaño variable. Se puede contagiar por vía venérea o por auto-inoculación. Estas lesiones se encuentran mayormente asociadas a los tipos 6, 11 y 42 de VPH (Pérez y Bascones 2010).

Hiperplasia epitelial multifocal. Son lesiones múltiples benignas, bien definidas, en forma de pápulas o placas del mismo color de la mucosa oral. Afecta labios y margen lateral de la lengua principalmente de niños de ambos géneros (González *et al.* 2011).

2.9 Detección de VPH

Estudios independientes han indicado que la detección del DNA del VPH, cuando se usa como método de detección primario, tiene mayor sensibilidad y valor predictivo negativo que la prueba convencional de citología líquida. Las pruebas del DNA de VPH pueden detectar aproximadamente 50% más neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que la prueba del Papanicolaou. Además, un estudio reciente en la India demostró que el uso de la prueba del DNA de VPH una vez en la vida reduce la mortalidad de cáncer cervical invasivo en aproximadamente el 50% (Grace 2008). El valor predictivo negativo para la prueba combinada de VPH y citología es muy alto, lo que es de particular interés para reducir los costos de las pruebas de detección de cáncer cervical. Un método de tipificación de VPH ampliamente utilizado en estudios clínicos y epidemiológicos es un ensayo comercial de hibridización líquida que no se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el Hybrid Capture 2 (HC2) (Digene) que puede detectar 13 tipos de *HR-HPV* (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 68) y 5 tipos de *LR-HPV* (tipos 6, 11, 42, 43 y 44) (Lorincz 1996). Sin embargo, este método solo puede detectar la presencia de infección sin revelar el tipo de VPH. Se han desarrollado y comercializado ensayos adicionales para identificar los tipos de HPV presentes en los especímenes cervicales, por ejemplo LINEAR ARRAY HPV Genotyping (Roche Molecular Diagnostics) y INNO-LIPA HPV genotyping (Innogenetics). Una limitación de todos los métodos de detección de VPH es su bajo valor predictivo positivo, no pudiendo discriminar entre infecciones VPH positivas con alteraciones morfológicas de las que no las tienen (Ronco y cols., 2006).

Debido a esta limitación de los ensayos de detección del VPH, la interpretación de datos de positividad para el VPH requiere de especial atención y un análisis más extensivo. Es necesario la búsqueda e implementación de marcadores adicionales para mejorar el valor predictivo positivo de los ensayos de detección del VPH (Grace y Davies 2008). Muchos estudios sugieren que el análisis de la carga viral, las transcripciones de VPH y/o expresión de genes anfitriones específicos facilitarán la identificación de infecciones por

VPH asociadas con lesiones cervicales. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales para corroborar los hallazgos iniciales y desarrollar estrategias que puedan ser adoptadas en los procedimientos clínicos de rutina.

Se han desarrollado vacunas que ayudan a prevenir la infección por ciertos tipos de VPH y algunas de las formas de cáncer que están relacionadas con estos tipos del virus. Gardasil, Gardasil 9 y Cervarix son los nombres de marcas de las vacunas utilizadas hoy en día. Todas estas vacunas ayudan a prevenir la infección por el VPH-16 y -18. Estos dos tipos son causantes del 70% de todos los casos de precáncer y cáncer de cuello uterino, así como muchos casos de cáncer de ano, pene, vulva, vagina y garganta. La vacuna Gardasil también ayuda a prevenir los dos tipos de VPH (VPH-6 y VPH-11) que causan la mayoría de las verrugas genitales. Gardasil 9 ayuda a prevenir la infección de los mismos 4 tipos del HPV que Gardasil más otros 5 tipos de los virus considerados de alto riesgo: 31, 33, 45, 52 y 58. En conjunto, estos tipos causan alrededor del 90% de los cánceres de cuello uterino y cáncer oral. A pesar de su eficacia, en países poco desarrollados no se ha logrado la implementación como profilaxis debido a la falta de recursos, por lo que el cáncer sigue siendo un problema de salud público en esta población (Grace y Davies 2008).

2.10 Detección de cáncer Oral

La mayoría de los protocolos clínicos actuales están basados en el estudio de biopsias quirúrgicas obtenidas de lesiones bucales. Recientemente se ha incorporado el uso de biomarcadores en fluidos orales para la detección de VPH asociados a cáncer oral, los cuales son de gran utilidad ya que son métodos no invasivos y menos costosos, permitiendo detectar el cáncer en etapas tempranas y así darle el adecuado seguimiento a la progresión de la enfermedad (Chai *et al.* 2015). Se han realizado estudios donde se demostró que los fluidos orales o fragmentos mucosos de la boca contienen diferentes elementos importantes tales como: hormonas, anticuerpos, factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas, etc., además de un gran número de células con material genético, así como proteínas que pueden permitir la detección de VPH y alteraciones en las células infectadas, lo que puede ayudar en la detección temprana de VPH como posible causante de cáncer oral (Linxweiler *et al.* 2015).

2.11 Distribución de tipos de HPV y variantes del gen E6.

Gonzalez-Losa *et al.*, 2013 y 2015 realizaron un estudio en pacientes sin síntomas de enfermedad oral aparente provenientes de Yucatán, México donde observaron una prevalencia del 14.8% y 14.0%, respectivamente. Kreimer *et al.*, en el 2010 realizaron un estudio que incluía 591 hombres mexicanos sanos, donde observaron una prevalencia del 5.9%, de los cuales 1% correspondían a tipos de alto riesgo, principalmente VPH-16.

En un estudio realizado en el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas en Perú (Arteaga *et al.* 2014), se obtuvo como resultado que el 75% de pacientes presentaron oncogenes E6 y E7 de VPH-16, el 15% de VPH-52, el 10% de VPH-18, el 5% VPH-33 y el 20% de VPH-6/-11. También se observó que un 50% presentaron infecciones simples por VPH-16 y 20% por VPH-6/-11, mientras que un 25% presentaron infecciones múltiples por VPH-16, -18, -33 y -52. Se concluyó que se detectó regiones oncogénicas E6 y E7 de VPH -16, -18, -33, -52, -6 y -11 mediante PCR en pacientes Papanicolaou negativo, con alta incidencia de oncogenes de VPH 16, y en menor grado de VPH 6/11, 18, 33 y 52.

Wang *et al.* 2012, realizaron un estudio donde asociaron las variantes genéticas combinadas de p73 y p53 con VPH-16 positivos en pacientes con cáncer orofaríngeo de la universidad de Texas, encontrando que las variantes genotípicas en p53 (Arg/Pro+Pro/Pro) y p73 (GC/AT+AT/AT) fueron significativamente asociadas con el tumor VPH positivo en estos pacientes, aumentando aún más si dichas variantes se encuentran en combinación.

Un estudio realizado en Argentina (Chiesa *et al.* 2016), se analizó la variabilidad genética y el perfil filogenético del gen L1 de variantes de VPH-16, -18, -31, -58, -6 y -11 en 128 secuencias. Para VPH-16, todas las secuencias analizadas tuvieron 3 inserciones de nucleótidos. Doce sustituciones de bases en VPH-58, 6 SNPs resultaron en cambios de aminoácidos, y otros SNPs fueron detectados como mutaciones silenciosas. Para el VPH-31, se detectaron 25 SNPs como mutaciones silenciosas. De los 8 SNPs detectados en VPH-18, tres produjeron cambios de aminoácidos, el resto de SNPs detectados fueron mutaciones silenciosas. Se identificaron 8 nuevas variantes en base a la secuencia de la región L1.

Ortiz-Ortiz *et al.* 2015 realizaron un estudio de variantes de VPH en 330 mujeres infectados con VPH-16 del estado de Guerrero, México y encontraron 27 variantes. 82.12% pertenecieron a variantes del sub-linaje Europeo, 17.58% a sub-linaje Asiático Americano 1 y 0.3% a sub-linaje Africano 2a. La más común fue E-G350 (40%), seguida de E-prototipo (13.03%), E-C188/G350 (11.82%), AA-a (10.61%), AA-c (6.07%) y E-A176/G350 (5.15%).

III. JUSTIFICACIÓN

El VPH es el patógeno viral mayormente asociado a procesos oncogénicos en humanos y constituye un importante factor de riesgo, particularmente, para el desarrollo de cáncer cérvico-uterino, cáncer en pene y cáncer oral, además, la infección por VPH es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más común. Según los reportes de la OMS cada año se presentan 300,400 nuevos casos y 145,4000 muertes por cáncer oral a nivel mundial, lo que en 2010 representó la séptima causa de cáncer en el mundo. La historia natural de la infección por VPH en la cavidad oral no está del todo clara, se cree que debido a similitudes histológicas entre las áreas cérvico-vaginal y orofaríngea y la capacidad del virus para immortalizar los queratinocitos orales humanos *in vitro*, ha permitido transferir el concepto de oncogenicidad inducida por el VPH del área ginecológica a la cavidad oral. En la actualidad se dispone de tres vacunas como Gardasil, Cervarix y Gardasil 9, que confieren protección contra los tipos 6/11/16/18, 16/18 y 16/18/ 31/33/45/52/58, respectivamente. La literatura indica que los genotipos más frecuentes son el VPH-18 y VPH-16 dentro del grupo de los de alto riesgo tanto para el desarrollo de cáncer oral y cervical en América Latina, sin embargo, estas vacunas no confieren inmunidad completa contra todos los demás genotipos de este virus.

En el Estado de Chiapas no hay estudios reportados de prevalencia, por lo que esta investigación se enfocara en la determinación de los genotipos predominantes en la cavidad oral. Por otra parte, debido a la gran variabilidad genética que presenta VPH es necesario identificar las variantes en las secuencias de DNA codificantes para proteínas oncogénicas como es E6 del VPH; las cuales pueden ser importantes para discriminar el potencial infeccioso y describir la existencia de nuevas variantes del VPH circulantes en el sur de México. Nuestros resultados pudieran servir para la identificación de biomarcadores relevantes para pronóstico en los pacientes y el estudio de variantes en estos genes podrían ser tomado en cuenta para el diseño de nuevas terapias y/o vacunas.

IV. HIPÓTESIS

Existe una alta prevalencia de infección por virus de papiloma humano y variabilidad en los genes E6 en cavidad oral de pacientes asintomáticos provenientes de Siltepec, Chiapas, México.

V. OBJETIVOS

General

- Identificar los genotipos de bajo y alto riesgo del virus del papiloma humano y variantes en la secuencia del gen E6 en cavidad oral de pacientes asintomáticos de Siltepec, Chiapas, México.

Específicos

1. Evaluar las alteraciones morfológicas de las muestras de cavidad oral de los pacientes en estudio.
2. Determinar la prevalencia de la infección por VPH en muestras de cavidad oral de los pacientes en estudio.
3. Identificar los genotipos de bajo riesgo y alto riesgo en los pacientes con infección por VPH.
4. Identificar variantes en las secuencias del gen E6 de los tipos de alto riesgo detectados en las muestras.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos

Este estudio fue sometido al comité de ética institucional. El propósito y los procedimientos del estudio fueron explicados a todos los participantes, los resultados fueron confidenciales y únicamente utilizados para fines de investigación científica, además, un consentimiento informado por escrito se obtuvo de cada participante y se le aplicó un breve cuestionario para documentar la historia clínica (Anexo 1).

6.2 Población y tamaño de muestra

Los pacientes que asistieron al servicio de Brigada Médica en la comunidad de Siltepec, del estado de Chiapas, México en el mes de abril del 2017, el número de muestras captadas fue de 198 pacientes.

6.3 Criterios de inclusión

- 1- Pacientes que manifestaron voluntariamente participar en el estudio.
- 2- Pacientes que firmaron el consentimiento informado.
- 3- Pacientes mayores o igual a 18 años de edad.
- 4- Pacientes que acudieron a la consulta por problemas orales.
- 5- Pacientes con o sin sintomatología clínica (lesiones indoloras, ganglios infartados con o sin dolor).

6.4 Criterios de exclusión

- 1- Pacientes que habían sido diagnosticados previamente con otro tipo de cáncer.
- 2- Paciente que estaban bajo tratamiento médico de terapia antitumoral, antimicrobiana y antiviral.
- 3- Pacientes que presentaban enfermedades sistémicas (autoinmunidad e inmunosupresión), hipertensión, desordenes hormonales, trastornos metabólicos e incapacidad psico-motoras.
- 4- Paciente que no aceptaron participar en el estudio y que no firmaron el consentimiento informado.

6.5 Toma de la muestra

Se colectaron muestras de la cavidad oral por el método de raspado de citología exfoliativa haciendo un movimiento rotatorio con un citocepillo (Cytology Brush; Medical Packaging Co, Camarillo, CA) en diferentes sitios de la cavidad oral como son: el dorso de la lengua, interior de las mejillas y paladar duro y blando, así como en el área donde se presentaba la lesión, si la había. Esto se realizó en duplicado, una para extracción de DNA viral y otro para pruebas citológicas.

En todas las muestras de frotis citológicos, se procedió a hacer la extensión de la misma suavemente cubriendo 2/3 partes de una lámina portaobjetos, evitando la formación de grumos y estrías, para la correcta conservación de las estructuras. Se realizó la fijación de la muestra inmediatamente después de tomarla, se roció Alcohol en CitoSpray (Byp Medical, México) que otorga una delgada protección celular.

Posteriormente, se procedió a lavar los cepillos utilizados para la toma de muestra oral en un tubo conteniendo solución conservadora (Tris-HCl al 10mM, NaCl al 1 mM, SDS al 0.5%; pH=8) empujando el cepillo hasta el fondo del vial 10 veces y girando con fuerza el cepillo, forzando la separación de las cerdas para liberar aún más material y se procedió a conservarlas a -20°C hasta la extracción de DNA.

6.6 Tinción con Hematoxilina-Eosina

La tinción de la muestra fue mediante la técnica de tinción con Hematoxilina-Eosina, la cual permite distinguir detalles morfológicos de las células y tejidos. Los pasos a seguir fueron los mencionados a continuación:

1. Lavado en agua corriente: utilizado para hidratar y limpiar las muestras, así como retirar el CitoSpray.
2. Hematoxilina de Harris (Fisher Scientific, Hampton, NH): utilizado para realizar la tinción nuclear de las células del frotis.
3. Lavado en agua corriente: utilizado para eliminar los excesos de colorante que queden en las muestras.
4. Agua ácida o alcohol ácido: utilizado para realizar la diferenciación de la coloración nuclear para la Hematoxilina, proceso llamado coloración regresiva.

5. Alcohol al 95%: utilizado para darle carácter alcohólico a las muestras para que reaccionen con el colorante del siguiente paso.
6. Orange G (Fisher Scientific): colorante alcohólico que tiñe el citoplasma de color anaranjado, el cual tiene afinidad electroestática con las proteínas, de todas las células en una primera instancia. Finalmente son las células escamosas superficiales queratinizadas las que obtienen una tinción orangeofílica.
7. Alcohol al 95%: utilizado para eliminar el exceso del colorante en las muestras.
8. EA-50 (Thermo-Scientific, Waltham, MA): es una mezcla de colorantes con afinidad por los citoplasmas celulares compuestos por la eosina que tiñe células superficiales e intermedias, el Verde Luz que tiñe células basales y parabasales y el Pardo Bismarck que tiñe células endocervicales.
9. Alcoholes 95% y 100%: inmersión rápida. Es importante estilar bien las muestras para evitar la dilución de los alcoholes, alteración del Xilol y su pérdida de capacidad como mordiente.
10. Xilol (Fisher Scientific): utilizado para el aclaramiento de la muestra.

Las preparaciones fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta la realización de estudios citológicos.

6.7 Estudios citológicos

Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a los hallazgos citológicos de las muestras orales de la siguiente manera: mujeres con citología normal y según el grado de inflamación observada. Los criterios de diagnóstico se basaron en el sistema Bethesda del 2001 (Solomon *et al.* 2002).

6.8 Extracción de DNA y detección del VPH

DNA viral de VPH fue extraído usando la técnica de Fenol cloroformo. Primeramente, se realizó la lisis enzimática al agregar RNasa (10µg/mL) y dejar incubar por 30 minutos a 37°C y luego Proteinasa K (1 mg/mL) por 1 hora a 56°C, posteriormente se incubó por 10 minutos a 95°C para su inactivación. Luego, se añadieron 500µL de Fenol cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugaron a 12,000×g por 5 minutos. Se procedió a separar la fase acuosa a otro tubo al que se le añadieron 500µL de cloroformo y se centrifugaron a 12,000×g por 5 minutos. Se separó la fase acuosa en otro tubo y se le

añadió Acetato de Sodio al 3M dejándolo precipitar por 2 horas a -20°C. Posteriormente, se le añadieron 500µL de etanol 100% frío y se centrifugó a 10,000×g durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Luego, se realizó un lavado con etanol al 75% y se centrifugó a 10,000×g durante 10 min a 4°C, eliminando el sobrenadante. Posteriormente, se procedió a resuspender el DNA agregando 50µL de TE al 1X e incubando a 65°C durante una hora. Al finalizar esto, se procedió a guardar el DNA a -80°C hasta su análisis.

Se realizó la amplificación del gen de β -actina utilizando los oligonucleótidos Fw 5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3' y Rv 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3' como control interno para evaluar si la extracción del DNA estuvo correcta. Esta se realizó por la técnica de PCR convencional y electroforesis en gel de acrilamida al 8%, teñidas con bromuro de etidio y visualizadas en el Transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad Lab). El producto esperado de la PCR fue de 203 bp.

La detección del VPH se realizó mediante la técnica de Nested PCR, utilizando PCR buffer de reacción 1X), los primers utilizados fueron: MY09 (5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3') y MY11 (5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3'), Taq DNA polimerasa (5U/µL), dNTP mix, 100 ng de DNA, agua libre de nucleasas para un volumen final de 25µL por reacción. Se utilizó el termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Lab, Hercules, CA, USA). La programación del equipo fue la siguiente: 1) Pre incubación a 95°C por 3 min. 2) Amplificación; 95°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 90 s, por 40 ciclos. 3) Extensión a 72°C por 4 min.

La segunda ronda de amplificación se realizó de la misma manera que la primera, solo que en esta ocasión, en lugar de añadir DNA, se añadió el producto de la primera ronda de PCR y los primers utilizados fueron los siguientes: GP5+ (5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3') y GP6+ (5'GAAAAATAAAGTGTAAATCATATTC3'). Se utilizó el termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Lab, Hercules, CA). La programación del equipo fue la siguiente: 1) Pre incubación a 94°C por 4 min. 2) Amplificación; 94°C por 1 min, 40°C por 2 min y 72°C por 90 s, por 40 ciclos. 3) Extensión a 72°C por 4 min.

Posteriormente, se realizó el montaje de los productos de PCR en un gel de acrilamida al 8% en tampón TBE 1X, luego se corrió a 90 volts por 45 minutos y se tiñó con Bromuro de Etidio y se colocó en un Transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad Lab) para la observación de los amplicones correspondientes a VPH.

6.9 Genotipificación en base a la secuencia del gen L1.

Se seleccionaron las muestras positivas para VPH para la caracterización molecular de los genes L1 de VPH por análisis de secuenciación. Se realizó la amplificación usando los primer GP5+/GP6+. Para la amplificación se preparó la mezcla de PCR utilizando la DNA Polimerasa Biolase (BioLine, Taunton, MA) que contenía los siguientes componentes: Buffer de reacción al 1X, MgCl₂ al 1.5 mM, dNTPs mix al 1 mM, 1 µM de primer forward, 1 µM de primer reverse, 2.5 unidades de Taq Polimerasa y 100 ng de DNA a un volumen final de 50 µL por reacción. Se utilizó el termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Lab, Hercules, CA, USA). La programación del equipo fue la siguiente: 1) Pre incubación a 95°C por 5 min. 2) Amplificación; 95°C por 20 s, 55°C por 20 s y 72°C por 30 s por 35 ciclos. 3) Extensión a 72°C por 10 min. Posteriormente, el producto de PCR se diluyó en azul de Bromofenol 5X (Promega, Madison, WI) y se cargó en un gel agarosa al 2% y poliacrilamida al 8% en tampón TBE al 1X, luego se corrió a 90 volts por 45 minutos, luego, se tiñó y se visualizaron los amplicones en un transiluminador de luz ultra violeta Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad Lab).

Los productos de PCR se purificaron utilizando un sistema de purificación GeneJET NGS Cleanup Kit (Thermo Scientific #K0851) y se sometieron a secuenciación automatizada utilizando Big Dye Terminator Chemistry v3.1 Ready Kit de reacción (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un secuenciador automático de DNA 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el primer GP6+. La secuenciación se realizó en el Instituto de Fisiología celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (IFC-UNAM).

Todas las secuencias dadas para una muestra se combinaron y se utilizaron para construir un *Contig*; solapamiento de los fragmentos de DNA que conforman una región

consenso de DNA. Las secuencias Contig fueron alineadas usando el programa Bionumerics v7.1 y comparadas con las secuencias conocidas del virus del papiloma humano. Las secuencias y electroferogramas se analizaron los programas Geneious v11.0.5 y FinchTV v1.4.0.

La genotipificación se tomó una región nucleotídica de hasta 50 bp ubicada río abajo al sitio de unión del primer GP5+. La región nucleotídica fue sometida a análisis de identidad usando el servidor BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la identificación de secuencias altamente similares.

6.10 Identificación de cambios nucleotídicos/aminoacídicos y análisis de variantes VPH-16

El gen VPH-16 E6 se amplificó utilizando cebadores específicos de tipo E6-F048 (5'-GAACCGAAACCGGTTAGTAT-3') y E6-R622 (5'-CAGTTGTCTCTGGTTGCAAA-3') que amplifican una región de ~575 bp. La PCR se realizó en una reacción de 50 µL que contenía 1 µM de cada oligonucleótidos, MgCl₂ al 4 mM y 1.25 U de ADN polimerasa Platinum Taq de alta fidelidad (Thermo-Scientific). El termociclador de PCR convencional se programó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de 95°C durante 45 s, 57°C durante 30 s, 72°C durante 1 min, y una extensión final al 72°C durante 10 min.

Los productos de PCR se purificaron usando GenJet NGS Cleanup Kit (Thermo-Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Estos se secuenciaron utilizando Big Dye Terminator Chemistry v3.1 Ready Kit de reacción (Applied Biosystems) en un secuenciador automático de DNA 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando los oligonucleótidos previamente descritos. La secuenciación se realizó en el Instituto de Fisiología celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (IFC-UNAM). Las secuencias se analizaron los programas Geneious v11.0.5 y FinchTV v1.4.0. Las secuencias se alinearon con la secuencia de referencia (VPH 16R).

Utilizando la secuencia E6, las variantes del VPH 16 se clasificaron en linajes con sus respectivos sub-linajes. Los sub-linajes fueron estratificados en clases.

6.11 Análisis estadístico

Las diferencias en la prevalencia del VPH para cada grupo se evaluaron mediante tablas de contingencia y se llevó a cabo la prueba de X^2 y prueba exacta de Fisher para variables de tipo nominal; para variables numéricas se utilizó la prueba de t de Student. Se consideró de significación estadística con un nivel de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico SPSS v22.

VII. RESULTADOS

En las muestras de citología oral teñidas con H&E no se observaron cambios morfológicos. Se realizó la extracción de DNA genómico a partir de las 198 muestras orales y posteriormente se evaluó la integridad y/o adecuación del DNA extraído mediante la detección del gen β -actina por PCR convencional. En todas las muestras incluyendo nuestro control positivo (DNA de la línea celular HeLa) se observó el amplicón esperado de ~203 bp para el gen β -actina, así como se observa en la Figura 1.

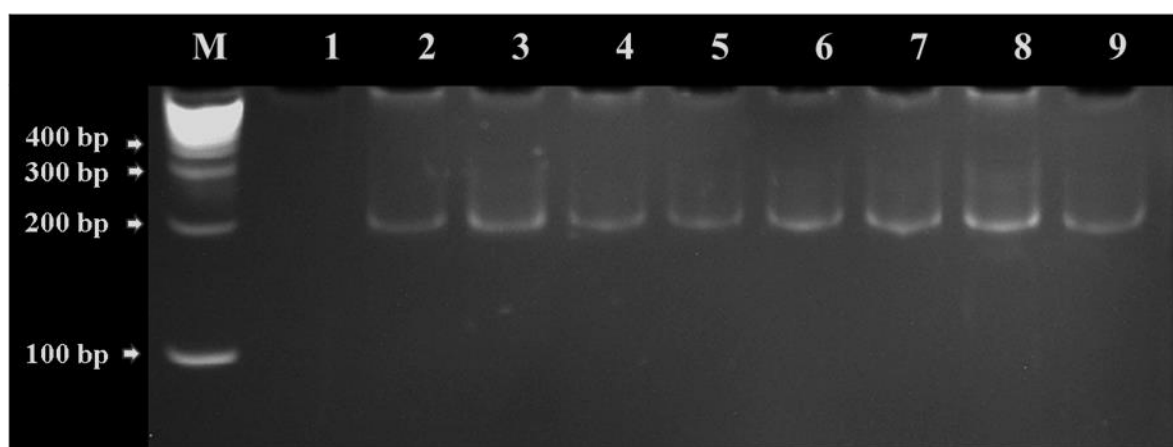


Figura 1. Amplificaciones de PCR convencional de una región para el gen β -actina. Gel de acrilamida al 8%. M; HyperLadder™ 100bp (Bioline, Tauton, MA). 1; control negativo (agua libre de nucleasas). 2; control positivo (DNA de línea celular HeLa con VPH tipo 18). 3-9; DNA de muestras de pacientes.

Para la detección de VPH se utilizaron dos pares de oligonucleótidos mediante Nested PCR: MY09/MY11 para la primera ronda de PCR, y GP5+/GP6+ para la segunda ronda; de esta última se obtuvo la amplificación de una región de ~150 bp del gen L1. Se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas donde no se observó amplicón y como control positivo se utilizó DNA de la línea celular HeLa donde sí se observó el amplicón esperado de ~150 bp, como se observa en la Figura 2. Se estableció la infección por VPH en las muestras donde se observó el amplicón esperado.

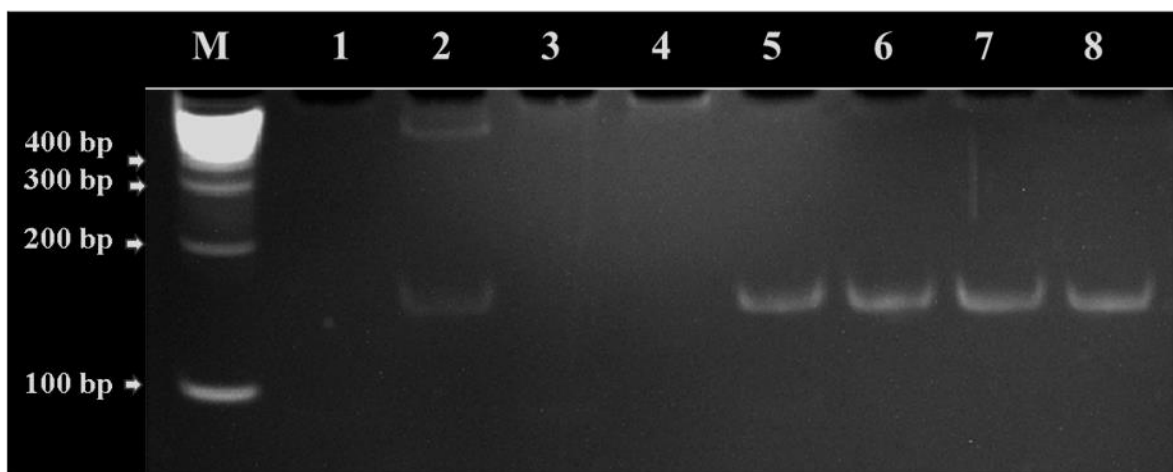


Figura 2. Amplificaciones de Nested PCR usando los oligonucleótidos GP5+/GP6+ para región de ~150 bp del gen L1 de VPH. Gel de acrilamida al 8%. M; HyperLadder™ 100bp (Bio line). 1; control negativo (agua libre de nucleasas). 2; control positivo (DNA de línea celular HeLa con VPH tipo 18). 3-4; DNA de pacientes negativos. 5-8; DNA de pacientes positivos.

Se observó una prevalencia de infección por VPH en cavidad oral 12.1% (24/198 de los pacientes) como se muestra en la Figura 3.

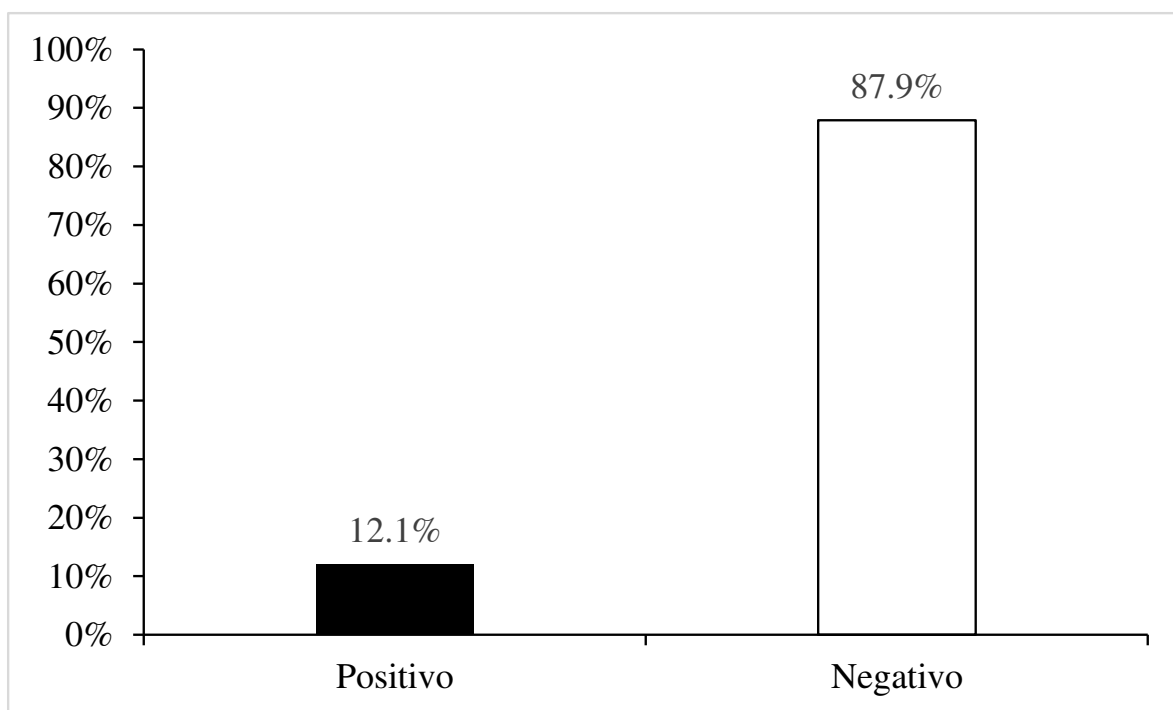


Figura 3. Prevalencia de VPH en la cavidad oral de pacientes asintomáticos de Siltepec, Chiapas, México.

Se realizó una breve encuesta a los pacientes para la recolección de datos relevantes como edad, sexo, hábitos, conductas sexuales, antecedentes de familiares con patologías orales, anormalidades en cavidad oral y estado gingival. Del total de pacientes el 69.2% (137/198) eran del género femenino y el 30.8% (61/198) eran del género masculino, además el promedio de edad fue 41.8 ± 15.3 , los datos se muestran en la Tabla 1. Se realizaron cruces de variables para la determinación de independencia y significancia estadística. El porcentaje de infección por VPH para el género femenino y masculino fue 50% (12/24) en ambos casos. El promedio de edad en los pacientes infectados por VPH fue de 46.88 ± 17.89 y en los pacientes sin infección fue de 41.12 ± 14.85 ($P=0.085$). No se observó asociación estadística entre la infección por VPH y hábitos de consumo de alcohol ($P=0.918$) y tabaco ($P=0.198$), todos los datos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución de la infección por VPH en la cavidad oral de pacientes asintomáticos por edad, género y hábitos.

	VPH (Nested PCR)			
	Total N=198	Positivo N=24	Negativo N=174	Valor de P
Género n (%)				
Femenino	137 (69.2)	12 (50.0)	125 (71.8)	0.0298 a
Masculino	61 (30.8)	12 (50.0)	49 (28.2)	
Edad				
Media (±DE)	41.82 (±15.32)	46.88 (±17.89)	41.12 (±14.85)	0.085 b
Consumo de bebidas alcohólicas n (%)				
Si	56 (28.3)	7 (29.2)	49 (28.2)	0.918 a
No	142 (71.7)	17 (70.8)	125 (71.8)	
Consumo de Tabaco n (%)				
Si	13 (6.6)	3 (12.5)	10 (5.7)	0.198 c
No	185 (93.4)	21 (87.5)	164 (94.3)	

a= Chi cuadrada, b= *t* de Student, c=Exacta de Fisher

El 62.5% (15/24) de los pacientes infectados por VPH manifestaron estar activos sexualmente ($P=0.182$). Sin embargo, se observó asociación estadísticamente

significativa entre la infección oral por VPH y el número de parejas sexuales, prácticas de sexo oral y el uso condón. El 58.4% (14/24) de los pacientes infectados manifestaron haber tenido igual o mayor a 3 parejas sexuales ($P=0.001$), además, el 79.2% (19/24) realizaban prácticas de sexo oral ($P=0.001$). El 33.3% (8/24) manifestaron nunca usar condón, el 41.7% (10/24) a veces usaban condón y 25% (6/24) siempre usaban condón entre los pacientes infectados ($P=0.001$), los datos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de la infección por VPH en la cavidad oral de pacientes asintomáticos por conductas sexuales.

	VPH (Nested PCR)			Valor de P
	Total N=198	Positivo N=24	Negativo N=174	
Sexualmente activo/a n (%)				
Si	146 (73.7)	15 (62.5)	131 (75.3)	0.182 a
No	52 (26.3)	9 (37.5)	43 (24.7)	
No. de parejas sexuales n (%)				
1	162 (81.8)	5 (20.8)	157 (90.2)	0.001 a
2	20 (10.1)	5 (20.8)	15 (8.6)	
≥ 3	16 (8.1)	14 (58.4)	2 (1.2)	
Prácticas de sexo oral				
Si	21 (10.6)	19 (79.2)	2 (1.2)	0.001 c
No	177 (89.4)	5 (20.8)	172 (98.8)	
Uso de condón				
Nunca	23 (11.6)	8 (33.3)	15 (8.6)	0.001 a
A veces	75 (37.9)	10 (41.7)	65 (37.4)	
Siempre	100 (50.5)	6 (25.0)	94 (54.0)	

a= Chi cuadrada, c=Exacta de Fisher

Se evaluó la relación de infección oral por VPH con el antecedente de algún familiar diagnosticado con cáncer de cabeza y cuello, el 20.8% (5/24) manifestó poseer este antecedente mientras que el 79.2% (19/24) manifestaron no tenerlo. Se identificaron lesiones en cavidad oral en 11 pacientes, donde 2/11 estaban infectados por VPH oral y 9/11 no lo estaban ($P=0.627$), a como se observa en la Tabla 3. Se observó asociación estadísticamente significativa entre el estatus gingival y la infección oral por VPH ($P=0.001$). El 58.3% (14/24) y 37.5% (9/24) de los pacientes infectados presentaron

inflamación leve e inflamación moderada, respectivamente; solo 1 paciente infectado por VPH no presentó inflamación gingival, los datos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Distribución de la infección oral por VPH en pacientes asintomáticos por antecedente familiar, lesión y estatus gingival.

	VPH (Nested PCR)			
	Total N=198	Positivo N=24	Negativo N=174	Valor de P
Familiar diagnosticado con cáncer de cabeza y cuello n (%)				
Si	15 (7.6)	5 (20.8)	10 (5.7)	0.023 c
No	183 (92.4)	19 (79.2)	164 (94.3)	
Lesión en cavidad oral n (%)				
Si	11 (5.6)	2 (8.3)	9 (5.2)	0.627 c
No	187 (94.4)	22 (91.7)	165 (94.8)	
Índice Gingival Modificado n (%)				
Sin inflamación	123 (62.1)	1 (4.2)	122 (70.1)	0.001 c
Inflamación leve	65 (32.8)	14 (58.3)	51 (29.3)	
Inflamación moderada	10 (5.1)	9 (37.5)	1 (0.6)	

c=Exacta de Fisher

Se realizó la genotificación de VPH mediante la secuenciación automatizada del fragmento de ~150 bp observado en la Nested PCR. Se realizó la purificación del amplicón a todas las muestras positivas y al control de la línea celular HeLa usando GeneJET NGS Cleanup Kit (Thermo Scientific), así como se observa en la Figura 4.

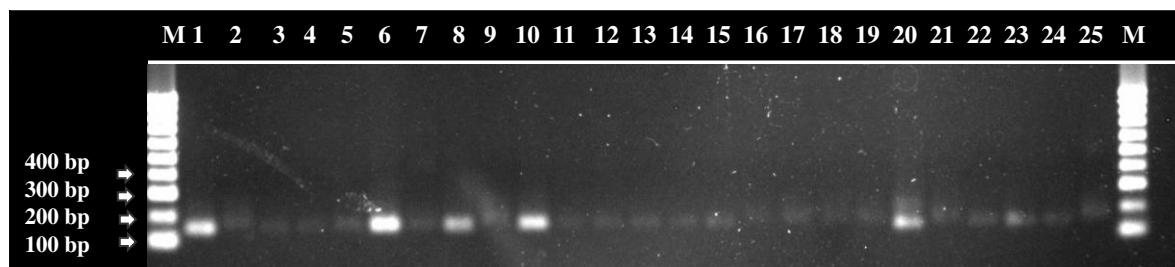


Figura 4. Amplicones de ~150 bp purificados usando GeneJET NGS Cleanup Kit (Thermo Scientific). Gel de agarosa al 1.5%. M; HyperLadder™ 100bp (Bioline). 1-24; positivas por Nested PCR. 25; control positivo (DNA de línea celular HeLa con HPV tipo 18).

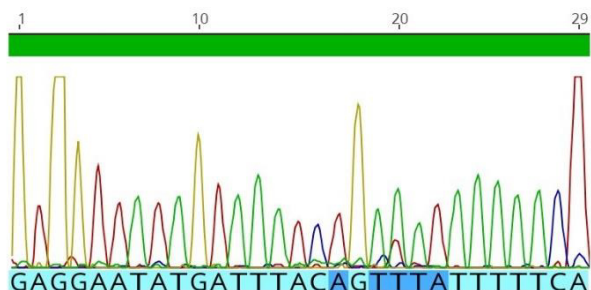
Para la secuenciación se utilizó el oligonucleótido GP6+. Se analizaron electroferogramas con el software Geneious v11.0.5 y se obtuvo un secuencia río abajo de hasta 29-50 bp al sitio de unión del oligonucleótido GP5+; región hipervariable en el gen L1 que permite una tipificación inequívoca de VPH.

Se realizó el alineamiento y análisis de identidad de las secuencias mediante BLAST (NCBI). Se identificaron los genotipos 13, 16, 32, 81 y 83. Por otra parte, se detectó el genotipo 18 en el control positivo de la línea celular HeLa. Los electroferogramas, alineamientos y análisis de identidad se muestran en las Figuras 5 y 6.

a) Identity

8_GP6.ab1 - bases 187 - 215

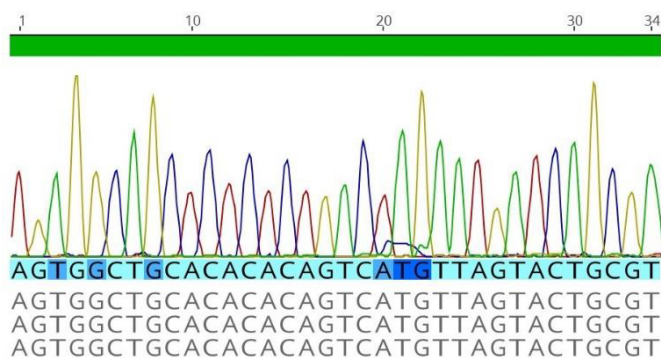
KX947269 (Human papillomavirus type 16 isolate ...
KX947270 (Human papillomavirus type 16 isolate ...
KX947271 (Human papillomavirus type 16 isolate]...



b) Identity

1_GP6.ab1 - bases 60 - 93

DQ344807 (Human papillomavirus type 13, com...
JN564005 (Human papillomavirus type 13 isolat...
KY690157 (Human papillomavirus type 13 isolat...



c) Identity

8_GP6.ab1 - bases 178 - 214

KM501528 (Human papillomavirus type 81 isolate ...
KM501529 (Human papillomavirus type 81 isolate ...
KM501530 (Human papillomavirus type 81 isolate ...

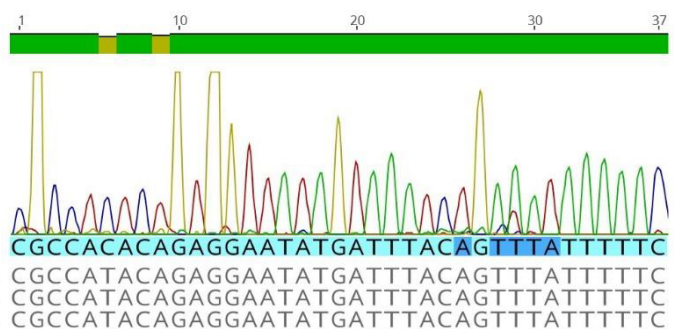


Figura 5. Electroferogramas, alineamientos y análisis de identidad. a) VPH genotipo 16, b) VPH genotipo 13 y c) VPH genotipo 81.

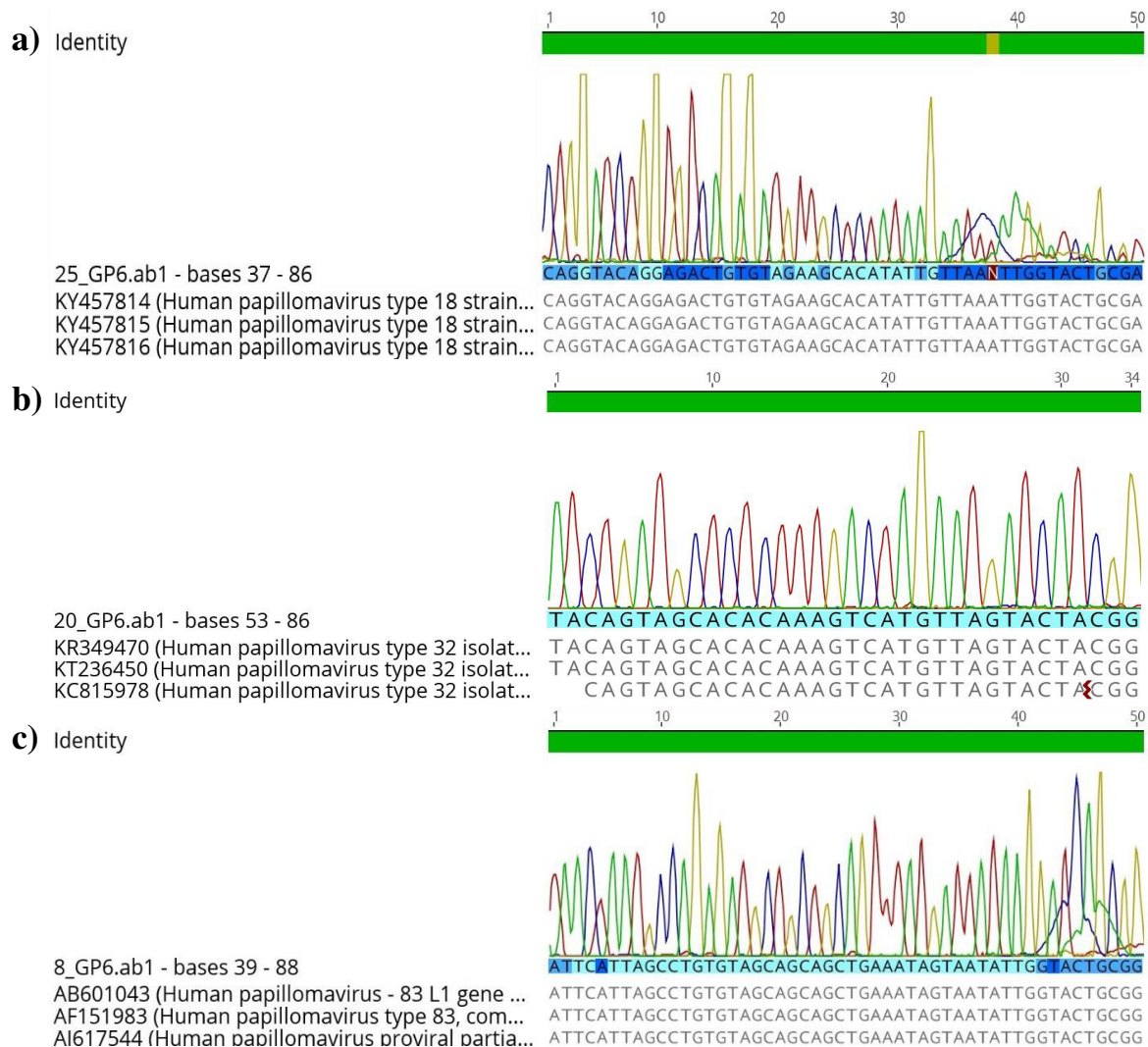


Figura 6. Electroferogramas, alineamientos y análisis de identidad. **a)** VPH genotipo 18 (control de la línea celular HeLa), **b)** VPH genotipo 32 y **c)** VPH genotipo 83.

En base a los resultados de genotipificación se identificó al VPH-13 como el más frecuente entre los pacientes positivos con el 87.5% (21/24), en menor frecuencia VPH-16 con 8.33% (2/24), seguido de VPH-32, VPH-81 y VPH-83 con el 4.17% (1/24) para cada genotipo; se observó co-infección de los genotipos VPH-13/VPH-16 y VPH-13/VPH-81, los datos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Frecuencias y porcentajes de los genotipos de VPH en los pacientes positivos.

Genotipos	Frecuencia	Porcentaje ^a
VPH-13	21	87.5
VPH-16	2	8.33
VPH-32	1	4.17
VPH-81	1	4.17
VPH-83	1	4.17
Co-infección		
VPH-13/ VPH-16	1	4.17
VPH-13/ VPH-81	1	4.17

a= porcentaje en base al total de positivos para VPH (n=24).

Para el análisis de variantes se amplificó la secuencia de E6 VPH-16 usando oligonucleótidos específicos de tipo y posterior secuenciación del amplicón de ~575 bp. El análisis de variantes se llevó a cabo en las 2 muestras positivas para el genotipo VPH-16. Se usó HPV16 R (Laboratorio Nacional Los Alamos, Genbank Accession NC_001526.4) como secuencia de referencia para el alineamiento de las secuencias obtenidas de los electroferogramas. En una de las muestras se observaron dos cambios nucleotídicos; G131 (de adenina a guanina en la posición 131) y G350 (de timina a guanina en la posición 350). Estos cambios nucleotídicos conllevaron a cambios aminoacídicos; R10G (de arginina a glicina en la posición 10) y L83V (de leucina a valina en la posición 83), como se observa en la Figura 7. La muestra se clasificó filogenéticamente como variante E-G131/G350 (linaje Europeo-Asiático/sub-linaje Europeo/Clase E-G350).

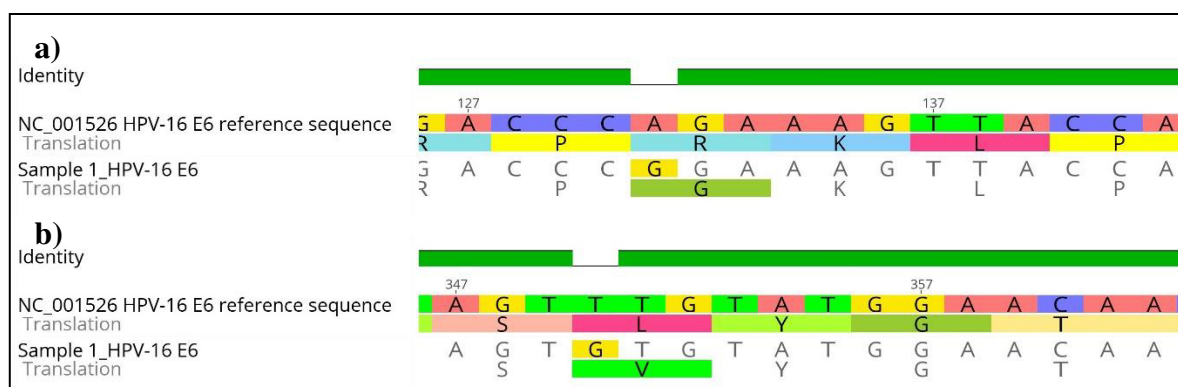


Figura 7. Variaciones en las secuencias nucleotídica y aminoacídica en E6 de VPH-16 (variante E-G131/G350, linaje Europeo-Asiático/sub-linaje Europeo/Clase E-G350); **a)** G131 y R10G; **b)** G350 y L83V.

En la otra muestra se observaron seis cambios nucleotídicos T145 (de guanina a timina en la posición 145), a286 (de timina a adenina en la posición 286), g289 (de adenina a guanina en la posición 289), T335 (de citosina a timina en la posición 335), G350 (de timina a guanina en la posición 350) y g532 (de adenina a guanina en la posición 532). De estos cambios solamente tres produjeron cambios aminoacídicos Q14H (de glutamina a histidina en la posición 14), H78Y (de histidina a tirosina en la posición 78) y L83V (de leucina a valina en la posición 83) como se observa en la Figura 8. La muestra se clasificó filogenéticamente como variante AA-a (linaje Asiático Americano/Norteamericano/sub-linaje Asiático Americano/clase AA-a).

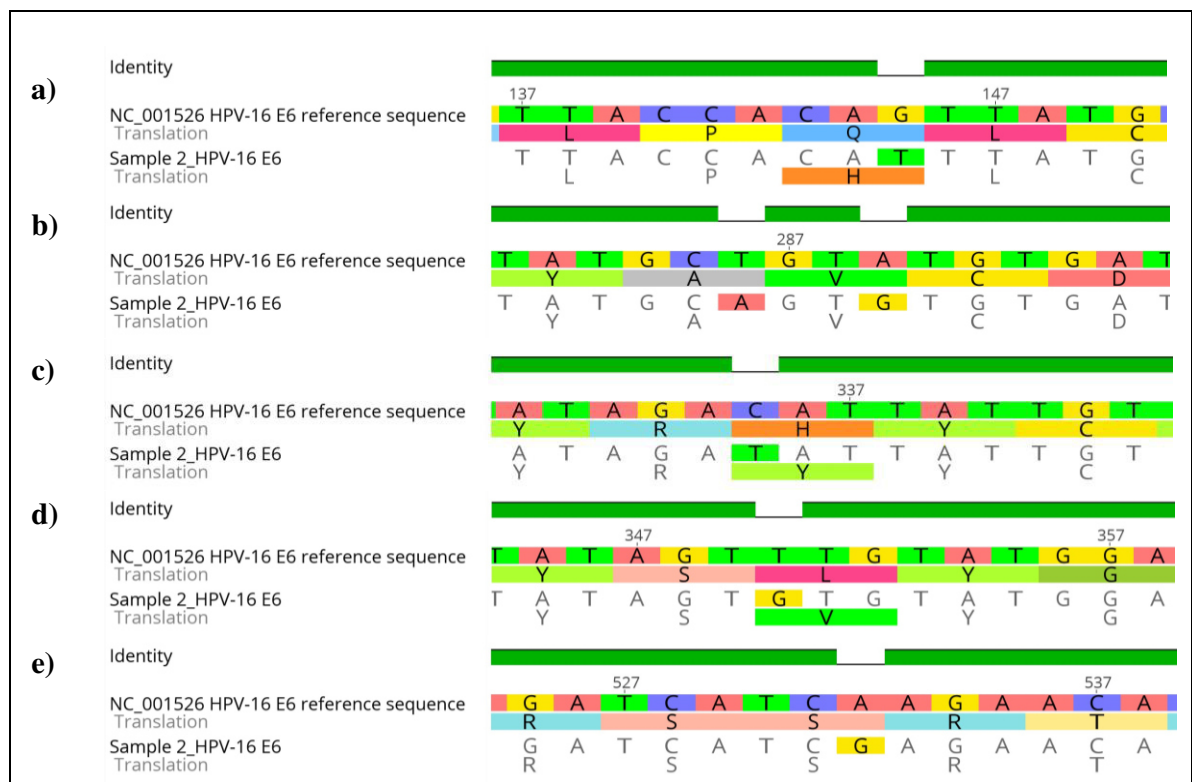


Figura 8. Variaciones en las secuencias nucleotídica y aminoacídica en E6 de VPH-16 (variante AA-a, linaje Asiático Americano/Norteamericano / sub-linaje Asiático Americano /clase AA-a); **a)** T145 y Q14H; **b)** a286/g289 y sin cambio; **c)** T335 y H78Y; **d)** G350 y L83V; **e)** g532 y sin cambio.

VIII. DISCUSIÓN

A nivel mundial investigadores han reportado la presencia del virus del papiloma humano en distintas áreas del cuerpo humano, una de ellas es la cavidad oral donde en los últimos años se ha asociado la infección con el desarrollo de patologías cancerosas como COCE. En México, existen pocos reportes sobre el papel de la infección por VPH en cavidad oral y sus implicaciones en una población asintomática y es de mucha importancia la documentación de los tipos y/o variantes de VPH en diferentes regiones geográficas donde la efectividad de las vacunas comerciales pudiera no prevenir la infección y patologías malignas en cavidad oral. El objetivo principal de nuestro estudio fue investigar la presencia de VPH en la mucosa oral de pacientes asintomáticos. Se realizó una PCR convencional para la detección del gen de Beta-actina (control interno) en las muestras donde el 100% resultaron positivas. Estos resultados permitieron garantizar que los procedimientos de toma de muestra y extracción de DNA fueron adecuados lo que permitió la ejecución de análisis posteriores en las muestras.

Varios estudios han demostrado la alta sensibilidad y especificidad del sistema Nested PCR usando los dos pares de oligonucleótidos MY09/11 y GP5+/GP6+ en comparación a otros métodos, por eso se utilizó en nuestro estudio (Entiauspe *et al.* 2013; Cai *et al.* 2013). Posteriormente análisis de secuenciación, lo cual nos garantiza la identificación inequívoca de cualquier tipo de VPH presente en la muestra.

El promedio de edad en los pacientes infectados por VPH fue ligeramente mayor (46.88 ± 17.89) respecto a los pacientes sin infección ($P=0.085$). No se observó asociación estadística entre la infección por VPH y hábitos de consumo de alcohol ($P=0.918$) y tabaco ($P=0.198$). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Ibieta-Zarco *et al.* 2005, donde tampoco observaron asociación estadísticamente significativa entre estas variables en pacientes diagnosticados con COCE. Gonzalez-Losa *et al.* 2015 realizaron un estudio epidemiológico en mujeres sin sintomatología de patología oral, sus resultados coinciden con los nuestros. Por otra parte, Kreimer *et al.* 2011 en un estudio multi-nacional incluyendo a México, encontraron que el consumo de tabaco es un factor fuertemente relacionado a la infección oral por VPH en individuos asintomáticos.

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la infección por VPH y diferentes conductas sexuales, tales como mayor número de parejas a lo largo de su vida,

prácticas de sexo oral y practica de sexo sin preservativo; resultado que concuerda con diversos estudios ya que se han reportado ampliamente como potenciales factores de riesgo para la infección por este virus (Smith *et al.* 2004). Esto pudiera estar relacionado con el principal mecanismo de transmisión del virus (transmisión sexual a través de fluidos y/o lesiones verrugosas) donde el uso de preservativos pudiera reducir la tasa de infección en cavidad oral.

La prevalencia de infección oral por VPH fue 6.05% tanto en hombres como en mujeres, por lo que no se observó asociación estadísticamente significativa entre el género de los pacientes y la infección por VPH. Kreimer *et al.* en el 2010 realizaron un estudio en individuos sanos donde encontraron similar prevalencia de VPH oral detectado en hombres y mujeres (4.6% y 4.4%, respectivamente).

Nosotros demostramos la presencia del DNA viral de VPH en el 12.1% (12/198) de pacientes entre las edades de 18 a 72 años provenientes de la comunidad de Siltepec, ubicada en el suroeste de México. Estos resultados indican una significativa prevalencia de la infección en nuestra población, datos que concuerdan con los reportados por Gonzalez-Losa *et al.* 2013, 2015 con una prevalencia del 14.8% y 14.0%, respectivamente. Estos dos estudios se realizaron en pacientes sin síntomas de enfermedad oral aparente provenientes de Yucatán, México. Kreimer *et al.* en el 2010 realizaron un estudio que incluía 591 hombres mexicanos sanos, donde observaron una prevalencia del 5.9%, de los cuales 1% correspondían a tipos de alto riesgo, principalmente VPH-16. Es posible que la detección de VPH en muestras de cavidad oral pudiera ser utilizada como una herramienta para el diagnóstico de tipos de VPH relacionados con el desarrollo de patologías orales.

Entre los pacientes infectados por VPH, en el 91.6% (22/24 pacientes) se identificaron genotipos de bajo riesgo oncogénico (VPH-13, -32, -81 y -83) y en el 8.33% (2/24) el genotipo VPH-16 considerado de alto riesgo oncogénico; se detectó infección mixta en dos pacientes VPH-13/16 y VPH-13/81. Estos datos concuerdan con los reportados por Jiménez *et al.* Venezuela quienes observaron 90.09% de genotipos de bajo riesgo (VPH-6, -13 y -32), donde el 45.45% correspondía al genotipo 13, además el 9% de las muestras presentaron infección mixta.

El genotipo con mayor prevalencia en nuestra población fue el genotipo VPH-13. Este genotipo está fuertemente asociado con la hiperplasia multifocal epitelial (*MEH*, por sus siglas en inglés), la cual es una rara patología de la mucosa oral que ha sido descrita en algunos grupos étnicos, principalmente en las Américas (Cuberos *et al.* 2006). Diversos estudios han reportado la existencia de esta patología en localizaciones mayas en el sur de México (Gonzalez-Losa *et al.* 2011, 2013; Lopez-Villanueva *et al.* 2011). Esta patología es caracterizada por lesiones asintomáticas que pueden desarrollarse en cualquier parte de la mucosa oral, pero más frecuentemente a nivel de la lengua, paladar blando y los labios. También se ha descrito la presencia de este genotipo viral en la mucosa oral en pacientes sin lesiones aparentes (Cuberos *et al.* 2006; Lopez-Villanueva *et al.* 2011, Gonzalez-Losa *et al.* 2013).

MEH típicamente se presenta durante la primera década de la vida. La infección asintomática en mujeres entre 16 y 40 años de edad podría jugar un rol en la transmisión y mantenimiento de este virus en la comunidad y dentro de las familias. Estos resultados sugieren la necesidad de estudios longitudinales para incrementar nuestros conocimientos de la dinámica de la infección por VPH-13, el cual hasta hace unos años era considerado genotipo exclusivo de la cavidad oral pero estudios recientes informaron que también puede encontrarse en el tracto genital, aunque con menor frecuencia. Illades-Aguilar *et al.* 2010 y Mattos *et al.* 2011 reportaron una prevalencia de este genotipo en cuello uterino de 0.1% y 4.3%, respectivamente. Estos bajos porcentajes de VPH-13 pudieran ser parcialmente explicados por el hecho de que varias técnicas de genotipificación de VPH no son capaces de determinar este tipo o debido a la distribución geográfica poco común de este genotipo.

Lopez-Villanueva *et al.* 2011 realizaron un estudio en Mérida, Yucatán en pacientes con *MEH* y en pacientes control, donde reportaron la presencia de VPH-13 en el 100% de las muestras de saliva examinadas. Estos resultados pudieran ser explicados por la transmisión doméstica del VPH-13 a través de la saliva y el uso compartido de objetos contaminados. Otro genotipo se encuentra asociado a *MEH* es el VPH-32, sin embargo, éste genotipo es frecuentemente detectado en el tracto genital; en nuestro estudio un paciente fue diagnosticado con este genotipo. Por otro lado, encontramos al genotipo VPH-16 en la cavidad oral de 2 pacientes y los genotipos VPH-32, -81 y -83 en 1

paciente cada uno. Nuestros resultados difieren de los observados por Gonzalez-Losa *et al.*, 2013, quienes identificaron los genotipos VPH-6, -58, -16, -81, -59 y -18.

Recientemente se introdujo un esquema de inmunización anti-VPH en algunos países, incluyendo México. La estrategia propuesta por México incluye prevención primaria con vacunación para niñas entre las edades de 9 y 16 años. Sin embargo, estudios en diversas regiones de México han detectado con alta frecuencia otros genotipos que no están incluidos dentro de este esquema. Además, las diferentes vacunas que existen actualmente fueron diseñadas para la prevención de lesiones precancerosas y CCE en el área anogenital, por lo que aún se desconoce su efectividad en la prevención de COCE.

De acuerdo a los análisis de secuenciación pudimos detectar variantes nucleotídicas del gen E6 y usarlas para investigar la heterogeneidad de VPH en nuestra población. Se conoce la existencia de múltiples variantes de VPH-16, las cuales están distribuidas por todo el mundo, por lo cual el riesgo de desarrollar carcinoma de células escamosas pudiera ser mayor en alguna población que en otra. En este estudio encontramos que una de las muestras fue clasificada como variante E-G131/G350, perteneciente al linaje Europeo-Asiático, sub-linaje Europeo y Clase E-G350; la otra variante AA-a de linaje Asiático Americano/Norteamericano, sub-linaje Asiático Americano y clase AA-a.

Ortiz-Ortiz *et al.* 2015 realizaron un estudio de variantes de VPH en 330 mujeres infectados con VPH-16 del estado de Guerrero, México y encontraron 27 variantes. 82.12% pertenecieron a variantes del sub-linaje Europeo, 17.58% a sub-linaje Asiático Americano 1 y 0.3% a sub-linaje Africano 2a. La más común fue E-G350 (40%), seguida de E-prototipo (13.03%), E-C188/G350 (11.82%), AA-a (10.61%), AA-c (6.07%) y E-A176/G350 (5.15%).

Se sabe que los genomas de las variantes del VPH-16 difieren geográficamente en todo el mundo debido a la evolución relacionada con los grupos étnicos y que el riesgo de carcinoma cervical parece ser dependiente de la población (Yamada *et al.* 1997; Zuna *et al.* 2009; Cornet *et al.* 2013). México es un país con diversos orígenes étnicos debido a que los inmigrantes europeos se mezclaron con varias poblaciones indígenas, en consecuencia la población actual porta la variante del VPH de varios grupos étnicos (Calleja-Macías *et al.* 2004).

IX. CONCLUSIONES

- Se observó una importante prevalencia de la infección por el virus del papiloma humano de 12.1% en la cavidad oral de pacientes asintomáticos
- La prevalencia de virus de papiloma humano fue asociada estadísticamente con las conductas sexuales de los pacientes como mayor número de parejas sexuales, sexo sin protección y prácticas de sexo oral.
- El genotipo 13 de virus de papiloma humano (clasificado de bajo riesgo oncogénico), fue el más frecuente en cavidad oral de pacientes asintomáticos.
- Se observó una baja frecuencia de genotipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico; dos pacientes fueron detectados con infección oral por virus de papiloma humano del genotipo 16.
- La detección de las variantes pertenecientes al sub-linaje Asiático Americano (AA-a) y Europeo (E-G131/G350) de los genotipos 16 con base en el gen E6 de virus de papiloma humano revela una alta diversidad genética que pudiera conllevar al desarrollo de patologías orales en población asintomática del suroeste de México.

X. PERSPECTIVAS

Es muy importante la ejecución de estudios con mayor número de muestra para establecer asociaciones entre la infección por VPH y variables epidemiológicas.

Un estudio de variantes de VPH en los tipos de alto riesgo oncogénico a partir de muestras orales y vaginales del mismo paciente permitiría conocer los riesgos patológicos e implicaciones en estas dos cavidades, así como la posible detección de variantes nunca antes reportadas.

Extender el estudio de variantes de VPH a diferentes regiones del país para establecer diferencias entre la región norte (Nuevo León) y el sur (Chiapas) de México.

Realizar estudios analizando en conjunto los tres principales genes de VPH (E6, E7 y L1) para analizar los cambios nucleotídicos y aminoacídicos para una mejor clasificación filogenética de las variantes.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Arteaga J, Rodríguez L, Pesantes M, Villanueva M. 2014. Detección molecular de regiones oncogénicas E6 y E7 de virus del papiloma humano mediante PCR en pacientes papanicolaou negativo del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas de La Libertad.2014. Sciendo; 17 (2).

Baseman JG, Koutsky LA. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol; 32 Suppl 1:S16-24.

Benuto ARE, Berumen CJ. 2009. Virus oncógenos: el paradigma del virus del papiloma humano. Dermatol Rev Mex;53(5):234-242.

Bodily J y Laimins LA. 2011. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. Trends in Microbiology, Vol. 19, No. 1, pp. 33-39, ISSN 0966-842X.

Bui T, Markham C, Ross M, Mullen P. 2013. Examining the association between oral health and oral HPV infection. Cancer Prevent Res; 6:917-24.

Cai YP(1), Yang Y, Zhu BL, Li Y, Xia XY, Zhang RF, Xiang Y. 2013. Comparison of human papillomavirus detection and genotyping with four different prime sets by PCR-sequencing. Biomed Environ Sci;26(1):40-7. doi: 10.3967/0895-3988.2013.01.005.

Calleja-Macías IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Gonzalez-Guerrero JF, et al. 2004. Genomic diversity of human papillomavirus- 16, 18, 31 and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. Virol. 2004;319:315–23.

Candotto V, Lauritano D, Nardone M, Baggi L, Arcuri C, Gatto R, Gaudio RM, Spadari F, Carinci F. 2017. HPV infection in the oral cavity: Epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. Oral & Implantology – Anno X –N.3.

Chai RC, Lambie D, Verma M, Punyadeera C. 2015. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. Cancer Med;4(4):596-607.

- Chiesa I, Pérez M, Núñez G, Pirola D. 2016. Genetic variability and phylogeny analysis of partial L1 gene of human papillomavirus variants in Buenos Aires, Argentina; *VirusDis.* 27(1):41–47. DOI 10.1007/s13337-015-0295-3.
- Cornet I, Gheit T, Lannacone MR, Vignat J, Sylla BS, Del Mistro A, et al. 2013. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer*;108:240–4.
- Cortés EM, Bonilla J, Díaz J, Hidalgo A, Romero-Córdoba S, Uren A, et al. 2013. Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue. *Virology*;447(1-2):155-65.
- Cruz L, Meyers C. 2013. Differential dependence on host cell glycosaminoglycan for infection of epithelial cells by high-risk HPV types. *PLoS One*;8(7):e68379.
- Cuberos V, Perez J, Lopez CJ, et al. Molecular and serological evidence of the epidemiological association of HPV 13 with focal epithelial hyperplasia. A case-control study. *J Clin Virol* 2006; 36: 21–26.
- D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison M. 2009. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis*; 199:1263-9.
- D'Andrilli G, Bovicelli A, Giordano A. 2010. HPV vaccines: state of the art. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 224, No. 3, pp. 567–847, ISSN 0021-9541.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C y Crawford L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, Vol. 352, No. 6368, pp. 824-827, ISSN 0028-0836.
- Entiausp L, Nunes E, Collares T, da Silveira MF, Seixas F. 2013. Comparison between two methods for molecular characterization of human papillomavirus. *J bras Doenças Sex Transm* 25(1): 13-15.

Gao P y Zheng J. 2010. High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *Virology Journal*, Vol.7, No 238, pp. 1-3, ISSN 1743-422X.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*; 92:709–720. [PubMed]

Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S, Tommasino M. 2015. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicallscience*; 9:526.

Gonzalez-Losa, María del Refugio, Barrera, Ernesto Soria, Herrera-Pech, Verónica, Conde-Ferrández, Laura, Puerto-Solís, Marylin, & Ayora-Talavera, Guadalupe. 2015. Epidemiology of oral HPV in the oral mucosa in women without signs of oral disease from Yucatan, Mexico. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 301-306. Epub March 31, 2015. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246120130976>.

González MR, Suarez RE, Canul J, Conde L y Eljure N. 2011. Multifocal epithelial hyperplasia in a community in the Mayan área of Mexico. *Int. J. Dermatol.*, 50(3):304-9.

Groves IJ, Coleman N. 2015. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol*; 235(4):527-38.

Howie HL, Katzenellenbogen RA y Galloway DA. 2009. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, Vol. 384, No. 2, (Feb 2009), pp. 324-334, ISSN 0042-6822.

Hubbers CU, Akgul B. 2015. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*; 6(3):244-8.

Huh KW, Zhou X, Hayakawa H, Cho J-Y, Libermann TA, Jin J, Harper JW y Munger K. 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of Virology*, Vol. 81, No. 18, pp. 9737-9747, ISSN 0022-538X.

Ibieta Blanca R. et al. 2005. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, Volume 99, Issue 3 , 311 – 315.

Jiménez C, Correnti M, Salma N, et al. 2001. Detección del virus papiloma humano en entidades clínicas benignas de la cavidad bucal, mediante la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación molecular. *Acta Odontol Venez*; 39: 10–15.

Jo H y Kim JW. 2005. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Therapy*, Vol. 3, pp 419-434, ISSN 1543-9135.

Kadaja M, Silla MT, Ustav E y Ustav M. 2009. Papillomavirus DNA replication from initiation to genomic instability. *Virology*, Vol. 384, No. 2, pp. 360-368, ISSN 0042-6822.

Kreimer AR, Villa A, Bhatia RK, Messeguer AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. 2010. Oral Human Papillomavirus in Healthy Individuals: A Systematic Review of the Literature. *Sexually Transmitted Diseases*, Volume 37, Number 6, June 2010.

Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, et al. 2011. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology; 20(1):172-182. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0682.

Korber B. 2000. HIV Signature and Sequence variation analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences*, Chapter 4, Allen G Rodrigo and Gerald H Learn, eds Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers:55–72.

Lechner MS y Laimins LA. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *Journal of Virology*, Vol. 68, No. 7, pp. 4262-4273, ISSN 0022-538X.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. 2011. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*;11(1):9-22.

Lima DP, Diniz DG, Moimaz SA, Sumida DH, Okamoto AC. 2014. Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis*;14(3):e184-8.

Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM. 2008. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol*; 44(1):10-22.

Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenfus A, Bohle RM, et al. 2015. Combination of p16 (INK4a)/Ki67 immunocytology and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer Cytopathol*; 123(4):219-29.

Liu JC, Parajuli S, Blackman E, Gibbs D, Ellis A, Hull A, et al. 2015. High prevalence of discordant human papillomavirus and p16 oropharyngeal squamous cell carcinomas in an African American cohort. *Head Neck*.doi: 10.1002/hed.24117.

Longworth MS y Laimins LA. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *microbiology and molecular Biology Reviews*, Vol. 68, No. 2, pp. 362 – 372, ISSN 1092-2172.

Lopez-Villanueva ME, Conde-Ferrández L, Ayora-Talavera G, Cerón-Espinosa JD, González-Losa M. 2011. Human papillomavirus 13 in a mexican mayan community with multifocal epithelial hiperplasia: could saliva be involved in household transmission?. *Eur J Dermatol*; 21(3):396-400. Doi: 10.1684/ejd.2011.1347.

Lorincz AT. 1996. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res*, 22, 629-36.

Luciano, R. & Oviedo, J. M. 2013. Virus del Papiloma Humano y cáncer bucal. *Acta Odontol. Venez.*, 51(1):1-3.

Martín F, Sánchez JG, Cano J, Campo J, del Romero J. 2013. Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*;18(3):439-44.

Mattos AT, Freitas LB, Lima BM, Miranda AE, Spano LC. 2011. Diversity and uncommon HPV types in HIV seropositive and seronegative women attending an STI clinic. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 786-793. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000200047>.

McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R. y McBride AA. 2006. Brd4 Is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *Journal of Virology*, Vol. 80, No. 19, pp. 9530-9543, ISSN 0168-1702.

Moody CA y Laimins LA. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 10, No. 8, pp. 550-560, ISSN 1474-175X.

Muñoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*; 24 Suppl 3:S3/1-10.

Nei M, Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol*; 3(5):418–26. PMID: 3444411.

Neville BW, Day TA. 2002. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*; 52(4):195-215.

Oliveira L, Santos L, Augusto E, Neves F. 2012. Identification of human papillomavirus type 53 L1, E6 and E7 variants in isolates from Brazilian women. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 71–76.

Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero L del C, Jiménez-López MA, et al. 2015. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal*;12:29. doi:10.1186/s12985-015-0242-3

Pagliusi S. 2013. Vaccines against Human Papillomavirus. World Health Organization.

Pérez L y Bascones A. 2010. Tumores Benignos de la mucosa oral. *Av. Odontoestomatol.*, 26(1):11-8.

Romanczuk H y Howley PM. 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. PNAS, Vol. 89, No. 7, pp 3159-3163, ISSN 0027-8424.

Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al. 2006. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial. Lancet Oncol, 7, 547-55.

Sanders AE, Slade GD, Patton LL. 2013. National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the US adult population reply. Oral Dis;19:106. [PubMed].

Sapp M, Volpers C, Müller M. y Streeck RE. 1995. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. Journal of General Virology, Vol. 76, No. 9, pp. 2407-2412, ISSN 0022-1317.

Schiller JT, Day PM y Kines RC. 2010. Current understanding of the mechanism of HPV infection. Gynecologic Oncology, Vol. 118, Suppl 1, S12-17, ISSN 0090-8258.

Sidrón MC, Somacarrera ML. 2015. Cáncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. Revisión de la literatura. Avances en Odontoestomatología; 31:247-59.

Sierra A, Saenz M, Fernández J, Salleras L, Cueto A, Gestal J, et al. 2008. Medicina preventiva y salud pública. Barcelona España. Editorial Elsevier Masson: 838.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002 Apr 24; 287(16):2114-9.

Stanley MA, Pett MR y Coleman N. 2007. HPV: from infection to cancer. Biochemical Society Transactions, Vol. 35, No 6, pp. 1456-1460, ISSN 0300-5127.

Thomas MC y Chiang CM. 2005. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. Molecular Cell, Vol. 17, No 2, pp, 251-264. ISSN 1097-2765.

Tindle RW. 2002. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 2, No., pp. 1-7, ISSN 1474-175X.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*; 65(2):87-108.

Veríssimo FJ, Medeiros FT. 2012. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. A Clinical Perspective. In Tech.

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. 2004. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*; 64:3878-84.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer C, Muñoz N, Bosh FX, et al. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*;71(3):2463–72.

Zendeli-Bedjeti L, Popovska M, Atanasovska-Stojanovska A, Duvlis S. 2017. Human Papillomavirus as a Potential Risk Factor for Oral Premalignant Lesions. *Acta Clin Croat*. 2017 Sep;56(3):369-374. doi: 10.20471/acc.2017.56.03.02.

Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, Dunn ST, Wang SS, Schiffman M, et al. 2009. Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *Int J Cancer*;125:2609–13.

Zur Hausen, H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, Vol. 384, No. 2, (Feb 2009), pp 260-265, ISSN 0042-6822.

RESUMEN BIOGRÁFICO

CYNTHIA SOFÍA URBINA RÍOS

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA Y VARIANTES DEL GEN E6 EN CAVIDAD ORAL DE PACIENTES ASINTOMÁTICOS DE SILTEPEC, CHIAPAS, MÉXICO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en la Ciudad de Estelí, Departamento de Estelí, Nicaragua el 18 de marzo de 1993, hija de Dana Ivonett Ríos Bellorín y José Joaquín Urbina Ortiz.

Educación: Egresada de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, grado obtenido Licenciatura en Bioanálisis Clínico en 2015.

Experiencia Profesional: Prácticas profesionales en el Hospital Regional San Juan de Dios, Estelí, desde 2013 hasta diciembre 2015.

Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROYECTO

**IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
Y VARIANTES DEL GEN E6 EN CAVIDAD ORAL DE PACIENTES
ASINTOMÁTICOS DE SILTEPEC, CHIAPAS, MÉXICO.**

Centro de Investigación y Desarrollo en ciencias de la Salud, Laboratorio de
Inmunología y Virología (LIV)

INTRODUCCIÓN

El cáncer oral ocupa un lugar importante en incidencia y mortalidad a nivel mundial, particularmente en México donde ha aumentado en los últimos 10 años. El VPH es el patógeno viral mayormente asociado a procesos oncogénicos en humanos y constituye un importante factor de riesgo, particularmente, para el desarrollo de cáncer cérvico-uterino, cáncer de pene y cáncer oral, además, la infección por VPH es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más común. Según los reportes de la IARC, el cáncer oral en el 2010 representó la séptima causa de cáncer a nivel mundial. En México, se reportan aproximadamente 4,000 nuevos casos cada año. Se han desarrollado vacunas como Gardasil, Cervarix y Gardasil 9, que confieren protección contra los tipos 6/11/16/18, 16/18 y 16/18/ 31/33/45/52/58, respectivamente. La literatura indica que los genotipos más frecuentes son el VPH-18 y VPH-16 dentro del grupo de los de alto riesgo tanto para el desarrollo de cáncer oral y cervical en América Latina, sin embargo, estas vacunas no confieren inmunidad completa contra todos los demás genotipos de este virus. En el Estado de Chiapas existen pocos estudios de prevalencia, por lo que en esta investigación se enfocara en el cáncer oral, además, se desconocen los genotipos predominantes que afectan a los pacientes asintomáticos en cavidad oral.

OBJETIVO

Identificar los genotipos de bajo y alto riesgo del virus del papiloma humano y variantes en la secuencia de los genes E6 en pacientes asintomáticos provenientes de Siltepec, Chiapas, México.

PROCEDIMIENTOS

Si Usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente:

Le haremos algunas preguntas acerca de sus signos y síntomas clínicos para documentar su historia clínica, el cuestionario tendrá una duración aproximada de 10 minutos, además se procederá a la exploración de la cavidad oral para detectar lesiones y/o malignidades que usted pudiera presentar, luego se le tomara una muestra de la región afectada con un citocepillo para la el análisis citológicos e identificación de los tipos de VPH. Le aclaramos que (tanto las entrevistas y/ o toma de muestras) serán realizadas por personal capacitado.

BENEFICIOS

Usted recibirá un beneficio directo por su participación en el estudio, ya que se le entregará reporte de los resultados citológicos y detección molecular de VPH.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información que Usted nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

RIESGOS POTENCIALES

Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Si alguna de las preguntas le hicieran sentir un poco incómodo (a), tiene el derecho de no responderla. En la toma de muestra usted pudiera sentir una sensación de quemadura producto del citocepillo.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA/RETIRO

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera la forma en cómo es tratado.

Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con el/la investigador/a) responsable del proyecto: Dr. Ricardo Gómez Flores, al siguiente número de teléfono (+52) 8329-4000 en un horario de 8 am a 5 pm. Si usted acepta participar en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

Nombre y Firma del participante

Nombre y Firma del Investigador